

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2002 年 7 月 11 日 (11.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/053593 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 14/705, C12N 15/12, C12P  
21/02, 21/08, C12Q 1/02, 1/68, A61K 45/00, 45/06, A61P  
9/10, 43/00, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/11530

(22) 国際出願日: 2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2000-400625 2000 年 12 月 28 日 (28.12.2000) JP  
特願 2001-115916 2001 年 4 月 13 日 (13.04.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修  
町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三輪 真敬  
(MIWA, Masanori) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県 つく  
ば市 松代 3 丁目 1 2 番地 1 武田松代レジデンス  
5 1 3 号 Ibaraki (JP). 伊藤 隆司 (ITO, Takashi) [JP/JP];  
〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 1 丁目 7 番地

9 武田春日ハイ ツ 7 0 4 号 Ibaraki (JP). 新谷 靖  
(SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府 大阪  
市 淀川区新高 6 丁目 1 4 番 8-6 0 6 号 Osaka (JP).  
宮嶋 伸行 (MIYAJIMA, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒305-0031  
茨城県 つくば市 吾妻 4 丁目 1 6-4 プレビュー吾  
妻 4 0 3 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒  
104-0028 東京都 中央区 八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡  
ビル 9 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特  
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規 G タンパク質共役型レセプタータンパク質およびその DNA

(57) Abstract: It is intended to search for a novel G protein-coupled receptor protein and clarify its function. More particularly speaking, a novel G protein-coupled receptor protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or its salt and a polynucleotide encoding the same are provided. Also, medicinal uses thereof, etc. are provided.

(57) 要約:

本発明は、新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を検索し、機能を解明すること  
を目的とする。

具体的には、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に  
同一のアミノ酸配列を含有する新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその  
塩およびそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。それらの医薬用途等の  
用途も提供する。



WO 02/053593 A1



---

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質およびそのDNA

## 技術分野

- 5      本発明は、ヒト腎臓由来の新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩などおよびそれをコードするDNAに関する。

## 背景技術

- 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異  
10      的なレセプタータンパク質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプ  
タータンパク質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein  
（以下、Gタンパク質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナ  
ル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっているこ  
とから、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質あるいは7回膜貫通型レセプ  
15      タータンパク質（7 TMR）と総称される。

- Gタンパク質共役型レセプタータンパク質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表  
面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経  
伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。  
レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシ  
20      グナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプ  
タータンパク質、特にGタンパク質共役型レセプタータンパク質との関係を明  
らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に  
関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

- 25      例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達  
物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれて  
いる。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応する  
レセプタータンパク質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未  
知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター

タンパク質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプタータンパク質においてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプタータンパク質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプタータンパク質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプタータンパク質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST)としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

従来、Gタンパク質共役型レセプターと生理活性物質（すなわち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（すなわち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるGタンパク質共役型レセプタータンパク質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、Gタンパク質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のGタンパク質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなGタンパク質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

。

Gタンパク質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質（すなわち、リガンド）の探索、また、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、Gタンパク質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、Gタンパク質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

本発明は、上記のように有用な新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を提供するものである。すなわち、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物、該Gタンパク質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、リガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との

結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）

5 またはその塩、およびリガンドと該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

## 10 発明の開示

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト腎臓由来の新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAに

15 コードされるタンパク質が7回膜貫通型のGタンパク質共役型レセプタータンパク質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

20 (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩、

(2) 配列番号：1、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14または配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有する上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩、

25

(3) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(4) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

- (5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (6) 配列番号：2、配列番号：6、配列番号：9、配列番号：12、配列番号：15または配列番号：18で表される塩基配列を含有する上記(4)記載のポリヌクレオチド、
- 5 (7) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- (8) 上記(7)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- (9) 上記(8)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法、
- 10 (10) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (11) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(10)記載の抗体、
- (12) 上記(10)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- 15 (13) 上記(10)記載の抗体を含有してなる医薬、
- (14) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド、
- 20 (15) 上記(14)記載のGタンパク質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬、
- (16) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド
- 25 の決定方法、
- (17) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(18) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

- 5 (19) 上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- 10 (20) 上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(21) 上記(4)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

- 15 (22) 上記(4)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

(23) 上記(4)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のmRNAの定量方法、

- 20 (24) 上記(10)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の定量方法、

(25) 上記(23)または上記(24)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法、

- 25 (26) 上記(23)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(27) 上記(24)記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合



物またはその塩のスクリーニング方法、

(28) 上記(26)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩、

5 (29) 上記(27)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩、

(30) 上記(26)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(31) 上記(27)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(32) 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患または感染症の予防・治療剤である上記

(20)、上記(30)または上記(31)記載の医薬、

(33) 哺乳動物に対して、上記(19)、上記(28)または上記(29)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患または感染症の予防・治療方法、

(34) 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患または感染症の予防・治療剤を製造するための上記(19)、上記(28)または上記(29)記載の化合物またはその塩の使用等に関する。

さらには、

(35) タンパク質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））の

アミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、  
5 1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩、

（36）上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは  
10 その塩または上記（3）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記（16）記載のリガンドの決定方法、

（37）リガンドが、例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、P  
15 ACAP27, PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、  
20 プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SD F-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$   
25 、MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エン

テロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）またはスフィンゴシン1-リン酸である上記（36）記載のリガンドの決定方法、

（38）（i）上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記（3）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、（ii）上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記（3）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記（17）記載のスクリーニング方法、

（39）（i）標識したリガンドを上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記（3）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記（3）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその塩または上記（3）記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（40）（i）標識したリガンドを上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（41）（i）標識したリガンドを上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記載のGタンパク質共役型レセプタータ

ンパク質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- 5       （４２）（ｉ）標識したリガンドを上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合における、標識した  
10   リガンドの該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- （４３）（ｉ）上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合と、（ii）上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質を  
15   介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- （４４）上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって  
20   該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合と、上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したGタンパク質共役型レセプタータンパク質に接触させた場合における、Gタンパク質共役型レセプター

タンパク質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（４５）上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を活性化  
5 する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27, PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バ  
10 ソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78  
15 , GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCX Cケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-C  
20 K1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）またはスフィンゴシン1-リン酸で  
25 ある上記（４３）または（４４）記載のスクリーニング方法、

（４６）上記（３８）～（４５）記載のスクリーニング方法で得られうるリガンドと上記（１）記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（４７）上記（３８）～上記（４５）記載のスクリーニング方法で得られうる

リガンドと上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（４８）上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記（１８）記載のスクリーニング用キット、

（４９）上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記（１８）記載のスクリーニング用キット、

（５０）上記（８）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧタンパク質共役型レセプタータンパク質を含有することを特徴とする上記（１８）記載のスクリーニング用キット、

（５１）上記（４８）～（５０）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（５２）上記（４８）～（５０）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（５３）上記（１０）記載の抗体と、上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記（１）のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

（５４）上記（１０）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のＧタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記（３）記載

の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

(55) 被検液と担体上に不溶化した上記(10)記載の抗体および標識化された上記(10)記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載の  
5 Gタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

(56) 上記(26)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

10 (57) 上記(27)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(58) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAまたはその変異DNAを有する非ヒトトランスジェニック動物、

15 (59) 非ヒト動物がゲッ歯動物である上記(58)記載の非ヒトトランスジェニック動物、

(60) ゲッ歯動物が、マウスまたはラットである上記(58)記載の非ヒトトランスジェニック動物、

(61) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコード  
20 するDNAまたはその変異DNAを有し、非ヒト動物において発現しうる組換えベクター、

(62) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

(63) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコード  
25 するDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、および

(62) 上記(1)記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAを用いた遺伝子診断剤等を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、hTGR21-1の疎水性プロット図である。

図2は、hTGR21-2の疎水性プロット図である。

図3は、hTGR21-3の疎水性プロット図である。

図4は、hTGR21-4の疎水性プロット図である。

5 図5は、hTGR21-5の疎水性プロット図である。

図6は、hTGR21-6の疎水性プロット図である。

図7は、TGR21のヒト組織における発現分布解析の結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

10 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質（以下、レセプタータンパク質と略記する場合がある）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である。

本発明のレセプタータンパク質は、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メ  
15 サンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞  
20 胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、  
25 副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列として



は、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 5      本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 10      実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 15      リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

- 20      配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質としては配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質、配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質、配列番号：11で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質、配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質、配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質が挙げられる。

- 25      また、本発明のレセプタータンパク質としては、①配列番号：1、5、8、11、14または17で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1、5、8、11、14または17で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは

、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1、5、8、11、14または17で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

本明細書におけるレセプタータンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をはじめとする、本発明のレセプタータンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）のいずれであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピルもしくは $n$ -ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプタータンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプタータンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの $\text{C}_{2-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミ

ル基、アセチルなどの $C_{2-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のレセプタータンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1、5、8、11、14または17で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質などが用いられる。

本発明のレセプタータンパク質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明のレセプタータンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプタータンパク質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1、5、8、11、14または17で表わされるアミノ酸配列を有するレセプタータンパク質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプタータンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20

個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

- 5 本発明の部分ペプチドとしては例えば配列番号：8の第2～483番目のアミノ酸配列などが挙げられる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）のいずれであってもよい。

- 10 さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプタータンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

- 15 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

- 20 本発明のレセプタータンパク質またはその塩は、上記したヒトや非ヒト哺乳動物の細胞または組織から公知のレセプタータンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラ

フィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT、HOObt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸

エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いた

5 テストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチル

10 オキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、

15 プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベン

20 ジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル

25 基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末

端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店



また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のレセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のレセプタータンパク質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のレセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のレセプタータンパク質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、6、9、12、15または18で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、6、9、12、15または18で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有

し、本発明のレセプタータンパク質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプタータンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

5 配列番号：2、6、9、12、15または18で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2、6、9、12、15または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

10 ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

15 該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

20 より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

また、配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

25 配列番号：8で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：9で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：11で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：12で表わされる塩基配列を含有するD

NAなどが用いられる。

配列番号：14で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：15で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 5 配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 10 本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

- 15 本発明に従えば、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはGタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNAとの相互作用を介してGタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。Gタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびGタンパク質共役型レセプタータンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でGタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。Gタンパク質共役

型レセプタータンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係、あるいは、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-ラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレン（psoralen）など）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金

属など)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピド、コ

レステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂  
質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロロホルメ  
ート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'  
5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着  
させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特  
異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌ  
クレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用  
の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリ  
コールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それ  
10に限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体  
外の遺伝子発現系、あるいはGタンパク質共役型レセプタータンパク質の生体内  
や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸公知の各種の方法で細胞  
に適用できる。

15 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペ  
プチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよ  
い。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来  
のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのい  
ずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラ  
20 スミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細  
胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase  
Polymerase Chain Reaction(以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅す  
ることもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(  
25 1)配列番号:2、6、9、12、15または18で表わされる塩基配列を有す  
るDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2)配列番号:2、6、9、  
12、15または18で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下で  
ハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプタータンパク質と実質的に  
同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセ

プタータンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

5 配列番号：2、6、9、12、15または18で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2、6、9、12、15または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

10 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のレセプタータンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のレセプタータンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプタータンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、  
15 、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

20 DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan（登録商標）-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan（登録商標）-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

25 クローン化されたレセプタータンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプタータンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のレ

セプタータンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、  
(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pCR4、pCR2.1、  
5 pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pSL301）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。  
10

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる  
15

これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。  
20

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺  
25



伝子（以下、Neor<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプタータンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシッツ・リサーチ,（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309（1981）〕, JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular Biology）, 120巻, 517（1978）〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459（1969）〕, C600〔ジェネティックス（Genetics）, 39巻, 440（1954）〕, DH5 $\alpha$ 〔Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28（1990）〕, DH10B〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）, 87巻, 4645-4649（1990）〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス（*Bacillus subtilis*）MI114〔ジーン, 24巻, 255（1983）〕, 207-21〔ジャーナ

ル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) , 95巻, 87 (1984)) などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D、20  
5 B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中  
10 腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、カイコ由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)  
15 217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 315巻, 592 (1985)] 〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズ  
20 ハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110 (1972) やジーン (Gene) , 17巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。  
25

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111 (

1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシー  
ジングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・  
5 ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988))などに記載の方法に従って行なうことができる。

10 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン  
20 、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in  
25 Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 $\beta$ -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることが

できる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

5 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

10 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や  
0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える  
15 。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で  
20 約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約

30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプタータンパク質を分離精製するには、例えば、  
5 下記の方法により行なうことができる。

本発明のレセプタータンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプタータンパク質の粗抽出液を得る  
10 方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプタータンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプタータンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。  
15  
20

このようにして得られるレセプタータンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩  
25 で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するレセプタータンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、

トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

このようにして生成する本発明のレセプタータンパク質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

10 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のレセプタータンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 15 [モノクローナル抗体の作製]

##### (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプタータンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、  
25 例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプタータンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することに

より行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用い  
5 られる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加  
10 され、約20~40℃、好ましくは約30~37℃で約1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプタータンパク質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し  
15 、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプタータンパク質等を加え、  
20 固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い  
25 。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。

培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

10     〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプタータンパク質等の抗原）とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプタータンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、20      どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、25      グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投



与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様に測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、

10、（1）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、（2）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、（3）遺伝子診断剤、（4）本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（5）本発明のレセプタータンパク質または

15その部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（6）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドの定量法、（7）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法、（8）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパ

20ク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（9）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、（10）細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、（11）細胞膜における本発明のレセプタータンパク

25質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（12）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和、（13）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作出などに用いることができる。

特に、本発明の組換え型Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや非ヒト哺乳動物に特異的なGタンパク質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明のレセプタータンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある）、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のレセプタータンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

（１）本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンド（アゴニスト）の決定

本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27、PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）

、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸など）の他に、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプタータンパク質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプタータンパク質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプタータンパク質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプタータ

ンパク質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該タンパク質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプタータンパク質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプタータンパク質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質に接触させた場合における、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞

内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプタータンパク質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるレセプタータンパク質としては、上記した本発明のレセプタータンパク質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプタータンパク質が適している。

10 本発明のレセプタータンパク質を製造するには、上記の発現方法が用いられるが、該レセプタータンパク質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus ; NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555～19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行うことができる。

25 したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプタータンパク質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

5 本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞としては、本発明のレセプタータンパク質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（  
10 Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（1500  
15 0rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプタータンパク質を含有する細胞やその膜画分中のレセプタータンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合  
20 活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の①～③の方法を実施するためには、適当なレセプタータンパク質画分と、標識  
25 した試験化合物が必要である。

レセプタータンパク質画分としては、天然型のレセプタータンパク質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP 27, PACAP 38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8,  $\text{GRO}\alpha$ ,  $\text{GRO}\beta$ ,  $\text{GRO}\gamma$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MIP-3 $\alpha$ /LARC, MIP-3 $\beta$ /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチジン酸（LPA）、スフィンゴシン1-リン酸などが好適である。

具体的には、本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプタータンパク質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社

）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種タンパク質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃～50℃、望ましくは約4℃～37℃で、約20分～24時間、望ましくは約30分～3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越える試験化合物を本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④～⑤の方法を実施するためには、該レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプタータンパク質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フ



オルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプタータンパク質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞、または本発明のレセプタータンパク質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

10 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②Gタンパク質共役型レセプタータンパク質標品

15 本発明のレセプタータンパク質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

##### ③標識試験化合物

20 市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S] などと標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu$ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

##### ④非標識試験化合物

25 標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

#### 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプタータンパク質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を  $5 \mu\text{l}$  加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を  $5 \mu\text{l}$  加えておく。

③反応液を除去し、 $1 \text{ ml}$  の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を  $0.2 \text{ N NaOH} - 1\% \text{ SDS}$  で溶解し、 $4 \text{ ml}$  の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプタータンパク質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、心臓、腎臓、膵臓、脾臓、精巣などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP（例、PACAP27、PACAP38）、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレーテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーテッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー（例、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、GCP-2、PF4、IP-10、Mig、PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー；MCAF/MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、eotaxin、RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、HCC-1、MIP-3 $\alpha$ /LARC、MIP-3 $\beta$ /ELC、I-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー；lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー；fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、リゾホスファチ

ジン酸（L P A）、スフィンゴシン 1-リン酸などが用いられる。

（２）本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

5      上記（１）の方法において、本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質をコードする DNA を、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

10      例えば、生体内において本発明のレセプタータンパク質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプタータンパク質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のレセプタータンパク質を該患者に投与し該レセプタータンパク質の量を補充したり、②（イ）本発明のレセプタータンパク質をコードする DNA を該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる  
15      細胞に本発明のレセプタータンパク質をコードする DNA を挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプタータンパク質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。すなわち、本発明のレセプタータンパク質をコードする DNA は、安全で低毒性な本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／ま  
20      たは治療剤として有用である。

本発明のレセプタータンパク質は、G タンパク共役型レセプタータンパク質である KIAA0758 [DNA Res., 5 (5), 277-286 (1998)] にアミノ酸配列レベルで、約 30 % 程度の相同性が認められる新規 7 回膜貫通型レセプタータンパク質である。

25      本発明のレセプタータンパク質または該レセプタータンパク質をコードする DNA は中枢疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害、うつ病、てんかんなど）、内分泌疾患（例えば、アジソン病、クッシング症候群、褐色細胞腫、原発性アルドステロン症、更年期障害、子宮内膜症など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、糖尿病合併症、肥満、痛風、白内障、高脂血症等）、癌（例えば、非小

細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、炎症性疾患(例えば、アレルギー、喘息、リュウマチ、関節炎、腎炎、肝炎、網膜症、膀胱炎、肺炎など)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、呼吸器系疾患(例えば、かぜ症候群、喘息、肺炎、肺高血圧症、肺血栓・肺塞栓など)、消化器系疾患(例えば、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃炎、逆流性食道炎、膵炎等)、免疫系疾患(例えば、自己免疫性疾患等)、または感染症(例えば、免疫機能不全、肺炎、サイトメガルウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染症、リケッチア感染症、細菌感染症など)などの予防および／または治療に有用である。

- 10 本発明のレセプタータンパク質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ア  
15 デノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質を  
20 コードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプタータンパク質または②該レセプタータンパク質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、  
25 賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ

チン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル  
ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨  
化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ  
ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な  
5 などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に  
さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物  
は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産  
出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ  
とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他  
10 の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナ  
トリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、  
エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリ  
コール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）  
などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いら  
15 れ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用しても  
よい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸  
ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイ  
ンなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど  
20 ）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤など  
と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒ  
ト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イ  
ヌ、サルなど）に対して投与することができる。

25 本発明のレセプタータンパク質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与  
方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化患者  
（60 kg として）においては、一日につき約 0.1 mg ~ 100 mg、好ま  
しくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口  
的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法な

どによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

### （3）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics），第5巻，874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America），第86巻

， 2 7 6 6 ～ 2 7 7 0 頁（ 1 9 8 9 年 ） ） などにより実施することができる。

（ 4 ） 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

- 5      本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、例えば、（ i ） 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または（ ii ） 形質転換体等に含まれる  
10      本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定することによる、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

- 15      （ i ） 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓、膵臓、脾臓、精巣など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

- 得られた細胞に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することができ、公知の手段  
25      によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

（ ii ） 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、該形質転換体に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、Gタンパク質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、(ロ) 本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。



該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

5     本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとするところができる。

10     このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

   該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば、動脈硬化症患者（6  
15     0 k gとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 k gとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1  
20     ～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 k gあたりに換算した量を投与することができる。

   （5）本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化  
25     させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

   本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば、中枢機能、循環機能、消化機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予

防および／または治療剤として用いることができる。

本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患としては例えば、中枢疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害、うつ病、てんかんなど）、内分泌疾患（例えば、アジソン病、クッシング症候群、褐色細胞種、原発性アルドステロン症、更年期障害、子宮内膜症など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、糖尿病合併症、肥満、痛風、白内障、高脂血症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、炎症性疾患（例えば、アレルギー、喘息、リュウマチ、関節炎、腎炎、肝炎、網膜炎、膀胱炎、肺炎など）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、呼吸器系疾患（例えば、かぜ症候群、喘息、肺炎、肺高血圧症、肺血栓・肺塞栓など）、消化器系疾患（例えば、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃炎、逆流性食道炎、膵炎等）、免疫系疾患（例えば、自己免疫性疾患等）、または感染症（例えば、免疫機能不全、肺炎、サイトメガルウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染症、リケッチア感染症、細菌感染症など）などが挙げられる。

該化合物を本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシ  
ル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の  
薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経  
口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味  
剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた  
製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる  
る。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるよ  
うにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨

化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～

20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

5 (6) 本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドの定量法

本発明のレセプタータンパク質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

10 本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプタータンパク質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和 49 年発行)

15 ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和 54 年発行)

(7) 本発明の G タンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法

20 本発明のレセプタータンパク質等を用いるか、または組換え型レセプタータンパク質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物(例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

25

このような化合物には、(イ) G タンパク質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを

促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（i）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、該レセプタータンパク質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプタータンパク質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプタータンパク質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプタータンパク質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合と、本発明のレセプタータンパク質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプタータンパク質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結

合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプタータンパク質等が得られる以前は、Gタンパク質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのGタンパク質共役型レセプタータンパク質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプタータンパク質も混在するために、目的とするレセプタータンパク質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプタータンパク質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプタータンパク質等としては、上記した本発明のレセプタータンパク質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプタータンパク質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプタータンパク質等などが適している。

本発明のレセプタータンパク質等を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とするタンパク質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear

polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年〕に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプタータンパク質等を含有するものとしては、公知の方法に従って精製したレセプタータンパク質等であってもよいし、該レセプタータンパク質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプタータンパク質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞としては、該レセプタータンパク質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質等と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。



該レセプタータンパク質等を含有する細胞や膜画分中のレセプタータンパク質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプタータンパク質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプタータンパク質画分としては、天然型のレセプタータンパク質画分か、  
10 またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプタータンパク質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標  
15 識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプタータンパク質標品を調製する。バッファーには、  
20  $\text{pH} 4 \sim 10$ （望ましくは $\text{pH} 6 \sim 8$ ）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプタータンパク質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセ  
25 プターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。 $0.01\text{ml} \sim 10\text{ml}$ の該レセプター溶液に、一定量（ $5000\text{cpm} \sim 500000\text{cpm}$ ）の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の

未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約 0℃から 50℃、望ましくは約 4℃から 37℃で、約 20分から 24時間、望ましくは約 30分から 3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント ( $B_0$ ) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ( $B_0 - \text{NSB}$ ) を 100%とした時、特異的結合量 ( $B - \text{NSB}$ ) が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプタータンパク質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプタータンパク質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプタータンパク質等を有する細胞株、上記の組換え型レセプタータンパク質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 5      リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプタータンパク質等、本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞、または本発明のレセプタータンパク質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

10      1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

- 15      孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②Gタンパク質共役型レセプター標品

本発明のレセプタータンパク質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに  $5 \times 10^5$  個/穴で継代し、37℃、5%  $\text{CO}_2$ 、95% air で2日間培養したもの。

20      ③標識リガンド

市販の [ $^3\text{H}$ ]、[ $^{125}\text{I}$ ]、[ $^{14}\text{C}$ ]、[ $^{35}\text{S}$ ] などで標識したリガンド

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$ に希釈する。

④リガンド標準液

- 25      リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプタータンパク質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu\text{l}$ の測定用緩衝

液を各穴に加える。

②  $10^{-3} \sim 10^{-10}$  Mの試験化合物溶液を  $5 \mu\text{l}$  加えた後、標識リガンドを  $5 \mu\text{l}$  加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに  $10^{-3}$  Mのリガンドを  $5 \mu\text{l}$  加えておく。

5 ③反応液を除去し、 $1 \text{ ml}$  の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを  $0.2 \text{ N NaOH} - 1\% \text{ SDS}$  で溶解し、 $4 \text{ ml}$  の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$10 \quad \text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

$B_0$  : 最大結合量

15 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプタータンパク質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) Gタンパク質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシ

20 トールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアゴニスト）、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプタータンパク質に対するアンタゴニスト）、(ハ) リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプ

25 タータンパク質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公

知の化合物であってもよい。

本発明のレセプタータンパク質等に対するアゴニストは、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

- 5 本発明のレセプタータンパク質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

- 10 リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 15 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

- 20 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与す

るのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

- (8) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば中枢機能、循環機能、消化機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプタータンパク質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）や本発明のレセプタータンパク質に対するリガンドは、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患としては前記したものが挙げられる。

- 該化合物やリガンドを本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物やリガンドは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ

ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産  
5 出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリ  
10 コール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸  
15 ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

さらに、上記予防・治療剤は適当な薬剤と組み合わせて例えば本発明のレセプ  
20 タータンパク質が高発現している臓器や組織を特異的なターゲットとしたDDS製剤として使用することもできる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

25 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても

異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（9）本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明の抗体は、本発明のレセプタータンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化レセプタータンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプタータンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプタータンパク質等の定量法を提供する。

上記（ii）においては、一方の抗体が本発明のレセプタータンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプタータンパク質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のレセプタータンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプタータンパク質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明のレセプタータンパク質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプタータンパク質量）に対応した抗体、抗原も



しくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、  
5 後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ －ガラクトシダーゼ、  
10  $\beta$ －グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用い  
15 ることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成  
20 樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプタータンパク質量を定量することができる。1次反応と2次  
25 反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させ

る等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプタータンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプタータンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次  
5 反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、レセプタータンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる  
10 。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体とし  
15 て固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗  
20 体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリー  
25 などが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプタータンパク質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細につい

ては、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイ  
ムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッ  
セイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書  
院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書  
院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書  
院、昭和62年発行）、「メソッズ・イン・エンジモロジー（Methods in  
ENZYMOLGY）」Vol. 70(Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol.  
73(Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical  
Techniques (Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques (Part  
D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part  
E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol.  
121(Immunochemical Techniques (Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal  
Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行) など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプタータン  
パク質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプタータンパク質ま  
たその塩を定量することによって、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に  
関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプ  
タータンパク質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発  
明のレセプタータンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製  
時の各分画中の本発明のレセプタータンパク質等の検出、被検細胞内における本  
発明のレセプタータンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

(10) 細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチ  
ドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドま  
たはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセ  
プタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニ

ングに用いることができる。

すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(ii) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

(iv) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば

、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX 100™、ツイーン20™など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプタータンパク質等と細胞由来のリン脂質や膜タンパク質などの膜成分が多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様に行なうことができ、ウエスタンブロットは公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドを定量することができる。

細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的

ストレスなどを与える一定時間前（30分前～24時間前、好ましくは30分前～12時間前、より好ましくは1時間前～6時間前）もしくは一定時間後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後～3日後、好ましくは1時間後～2日後、より好ましくは1時間後～24時間後）、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後～7日後、好ましくは1日後～3日後、より好ましくは2日後～3日後）、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

(iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、脾臓、精巣など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での該レセプタータンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

(iv) 本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させ

る作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、Gタンパク質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、（ロ）細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

- 10     該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 15     該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプタータンパク質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとする

20     ことができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 25     該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても

異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

（11）細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプタータンパク質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、細胞膜における本発明のレセプタータンパク質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患としては前記したものが挙げられる。

該化合物を本発明のレセプタータンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨



化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者（60 kg として）においては、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~

20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

- 5 (12) 本発明のレセプタータンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和

本発明のレセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の、それらレセプタータンパク質などに対する中和活性とは、すなわち、該レセプタータンパク質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプタータンパク質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプタータンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する  
10 活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。したがって、該レセプタータンパク質の過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

該レセプタータンパク質の過剰発現などに起因する疾患としては例えば、中枢疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害、うつ病、てんかんなど）、内  
20 分泌疾患（例えば、アジソン病、クッシング症候群、褐色細胞種、原発性アルドステロン症、更年期障害、子宮内膜症など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、糖尿病合併症、肥満、痛風、白内障、高脂血症等）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）、炎症性疾患（例えば、アレルギー、喘息、リュウマチ、関節炎、腎炎、肝炎、網膜症  
25 、膀胱炎、肺炎など）、循環器疾患（例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等）、呼吸器系疾患（例えば、かぜ症候群、喘息、肺炎、肺高血圧症、肺血栓・肺塞栓など）、消化器系疾患（例えば、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃炎、逆流性食道炎、膵炎等）、免疫系疾患（例えば、自己免疫性疾患等）、または感染症（例えば、免疫機能不全、肺炎、サイトメガルウイルス、インフルエンザウイル

ス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染症、リケッチア感染症、細菌感染症など）などが挙げられる。

(13) 本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNA  
5 Aを有する動物の作出

本発明のDNAを用いて、本発明のレセプタータンパク質等を発現するトランスジェニック動物を作出することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する場合がある）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギなどが  
10 好適である。

本発明のDNAを対象動物に導入させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを導入させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種  
15 プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプタータンパク質等を高産生するDNA導入動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。  
20

受精卵細胞段階における本発明のDNAの導入は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプタータンパク質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプタータンパク質等を有す  
25 ることを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプタータンパク質等を有する。

本発明のDNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相

同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが導入された動物は、本発明のレセプタータンパク質等が高発現させられているので、本発明のレセプタータンパク質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプタータンパク質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプタータンパク質等について分析することができる。本発明のレセプタータンパク質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプタータンパク質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸

	d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
5	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
10	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
15	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
20	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
25	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	*	: 終止コドンに対応する

	Me	: メチル基
	Et	: エチル基
	Bu	: ブチル基
	Ph	: フェニル基
5	TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	Tos	: p-トルエンスルフォニル
10	CHO	: ホルミル
	Bzl	: ベンジル
	Cl <sub>2</sub> Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
15	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェノール
	Trt	: トリチル
20	Bum	: t-ブトキシメチル
	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
25	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
	DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号: 1

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1  
- 1 のアミノ酸配列を示す。

配列番号：2

配列番号：1 で示されるヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク  
5 質h T G R 2 1 - 1 をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号：3

以下の実施例1におけるP C R反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す

。

配列番号：4

10 以下の実施例1、2、3、4、5におけるP C R反応で使用したプライマー2  
の塩基配列を示す。

配列番号：5

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1  
- 2 のアミノ酸配列を示す。

15 配列番号：6 -

配列番号：5 で示されるヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク  
質h T G R 2 1 - 2 をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号：7

以下の実施例2におけるP C R反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す

20 。

配列番号：8

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1  
- 3 のアミノ酸配列を示す。

配列番号：9

25 配列番号：8 で示されるヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク  
質h T G R 2 1 - 3 をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号：10

以下の実施例3におけるP C R反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す

。

配列番号：1 1

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1-4のアミノ酸配列を示す。

配列番号：1 2

- 5 配列番号：1 1で示されるヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1-4をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号：1 3

以下の実施例4におけるP C R反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

- 10 配列番号：1 4

本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1-5のアミノ酸配列を示す。

配列番号：1 5

- 15 配列番号：1 4で示されるヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1-5をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

配列番号：1 6

以下の実施例5、6におけるP C R反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。

配列番号：1 7

- 20 本発明のヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1-6のアミノ酸配列を示す。

配列番号：1 8

配列番号：1 7で示されるヒト由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質h T G R 2 1-6をコードするc D N Aの塩基配列を示す。

- 25 配列番号：1 9

以下の実施例6におけるP C R反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す。

配列番号：2 0

以下の実施例7におけるP C R反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す。



。

配列番号：2 1

以下の実施例 7 における P C R 反応で使したプライマー 2 の塩基配列を示す

。

5 配列番号：2 2

以下の実施例 7 における P C R 反応で使したプローブの塩基配列を示す。

以下の実施例 1 で得られた形質転換体、大腸菌 (*Escherichia coli*)TOP10/pCR2.1-hTGR21-1は、形質転換体、大腸菌 (*Escherichia coli*)

10 TOP10/pCR2.1-hTGR21として2001年(平成13年)3月19日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(NIBH))に寄託番号FERM BP-7516として、2001年(平成13年)3月7日から大阪府大阪市淀川区十三本町2  
15 -17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16585として寄託されている。

### 実施例

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範  
20 囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

実施例 1 ヒト腎臓のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

25 ヒト腎臓cDNA(CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(配列番号：3)およびプライマー2(配列番号：4)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを1/10量鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix(CLONTECH社)1/50量、プライマー1(配列番号：3)およびプライマー2(配列番号：4)を各0.5 μM、dNTPs 200

$\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを1/5量、GC Meltを1/5量加え、20  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94℃・5分の後、94℃・30秒、60℃・30秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返し、最後に68℃・5分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列（配列番号：2）を得た。また、このアミノ酸配列（配列番号：1）を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をhTGR21-1と命名した。また形質転換体は大腸菌（*Escherichia coli*）TOP10/pCR2.1-hTGR21-1と命名した。

#### 実施例2 ヒト腎臓のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト腎臓cDNA（CLONTECH社）を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1（配列番号：7）およびプライマー2（配列番号：4）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを1/10量鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix（CLONTECH社）1/50量、プライマー1（配列番号：7）およびプライマー2（配列番号：4）を各0.5  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを1/5量、GC Meltを1/5量加え、20  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94℃・5分の後、94℃・30秒、60℃・30秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返し、最後に68℃・5分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列（配列番号：6）を得た。また、このアミノ酸配列（配列番号：5）を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をhTGR21-2と命名した。

実施例3 ヒト腎臓のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト腎臓cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 10) およびプライマー2 (配列番号: 4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを1/10量鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1 (配列番号: 10) およびプライマー2 (配列番号: 4) を各0.5  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを1/5量、GC Meltを1/5量加え、200  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94℃・5分の後、94℃・30秒、60℃・30秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返し、最後に68℃・5分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTAクローニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1 (Invitrogen社) へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列 (配列番号: 9) を得た。また、このアミノ酸配列 (配列番号: 8) を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をhTGR21-3と命名した。

20 実施例4 ヒト腎臓のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト腎臓cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 13) およびプライマー2 (配列番号: 4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを1/10量鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1 (配列番号: 13) およびプライマー2 (配列番号: 4) を各0.5  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを1/5量、GC Meltを1/5量加え、200  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94℃・5分の後、94℃・30秒、60℃・30秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返し、最後に68℃・5分の伸長

反応を行った。該PCR反応産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列（配列番号：12）を得た。また、このアミノ酸配列（配列番号：11）を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をhTGR21-4と命名した。

#### 実施例5 ヒト腎臓のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト腎臓cDNA（CLONTECH社）を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1（配列番号：16）およびプライマー2（配列番号：4）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを1/10量鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix（CLONTECH社）1/50量、プライマー1（配列番号：16）およびプライマー2（配列番号：4）を各0.5 μM、dNTPs 200 μM、および酵素に添付のバッファーを1/5量、GC Meltを1/5量加え、200 μlの液量とした。PCR反応は、94℃・5分の後、94℃・30秒、60℃・30秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返し、最後に68℃・5分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列（配列番号：15）を得た。また、このアミノ酸配列（配列番号：14）を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をhTGR21-5と命名した。

#### 実施例6 ヒト腎臓のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト腎臓cDNA（CLONTECH社）を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1（

配列番号：16）およびプライマー2（配列番号：19）を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを1／10量鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix（CLONTECH社）1／50量、プライマー1（配列番号：16）およびプライマー2（配列番号：19）を各0.5  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを1／5量、GC Meltを1／5量加え、20  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94℃・5分の後、94℃・30秒、60℃・30秒、68℃・4分のサイクルを35回繰り返し、最後に68℃・5分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNA配列（配列番号：18）を得た。また、このアミノ酸配列（配列番号：17）を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をhTGR21-6と命名した。

h T G R 2 1 - 1 ～ 6 の疎水性プロット図をそれぞれ図1～6に示す。

#### 実施例7 TGR21のヒト組織における発現分布解析

TGR21のヒト組織における発現分布解析はTaqMan PCR法を用いることにより調べた。鋳型としては、Human Multiple Tissue cDNA Panel（クロンテック社）を用い、PCR用プライマーとしてプライマー1（配列番号：20）及びプライマー2（配列番号：21）を、また配列番号：22を有するプローブを使用してTaqMan PCRを行った。該反応における反応液組成は、TaqMan Universal PCR Master Mix（アプライドバイオシステムズジャパン）を12.5  $\mu$ l、10  $\mu$ Mのプライマー1とプライマー2を各0.5  $\mu$ l、5  $\mu$ Mのプローブを1  $\mu$ l、鋳型を2  $\mu$ l、蒸留水を8.5  $\mu$ lの合計25  $\mu$ lであり、PCR反応は、50℃・2分、95℃・10分保持した後、95℃・15秒、60℃・1分のサイクルを40回繰り返した。得られた結果を基にcDNA 1  $\mu$ l当たりのコピー数として算出した結果を図7に示す。これよりTGR21の発現量は、腎臓・脾臓で高く発現していることがわかった。

## 産業上の利用可能性

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体）は、①リガンド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプタータンパク質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作出または⑧遺伝子治療剤等の医薬等として用いることができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするGタンパク質共役型レセプタータンパク質  
5 またはその塩。
2. 配列番号：1、配列番号：5、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14または配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩。
3. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドま  
10 たはその塩。
4. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：2、配列番号：6、配列番号：9、配列番号：12、配列番号：  
15 15または配列番号：18で表される塩基配列を含有する請求項4記載のポリヌクレオチド。
7. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
8. 請求項7記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
9. 請求項8記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のGタンパク質共役型レ  
20 セプタータンパク質またはその塩を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩の製造法。
10. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
11. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のシグナル伝達  
25 を不活性化する中和抗体である請求項10記載の抗体。
12. 請求項10記載の抗体を含有してなる診断薬。
13. 請求項10記載の抗体を含有してなる医薬。
14. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項1記載

のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンド。

15 15. 請求項14記載のGタンパク質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬。

16. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項  
5 3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

17. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項  
3記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項  
10 1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

18. 請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくは請求項  
3記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求  
項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその塩との結合性を  
15 変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

19. 請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニ  
ング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型  
レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩  
。

20 20. 請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニ  
ング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型  
レセプタータンパク質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩  
を含有してなる医薬。

21. 請求項4記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイ  
25 ブリダイズするポリヌクレオチド。

22. 請求項4記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

23. 請求項4記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のmRNAの定量方



法。

24. 請求項10記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の定量方法。

25. 請求項23または請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法。

26. 請求項23記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

27. 請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

28. 請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩。

29. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩。

30. 請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

31. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項1記載のGタンパク質共役型レセプタータンパク質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

32. 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患または感染症の予防・治療剤である請求項20、請求項30または請求項31記載の医薬。

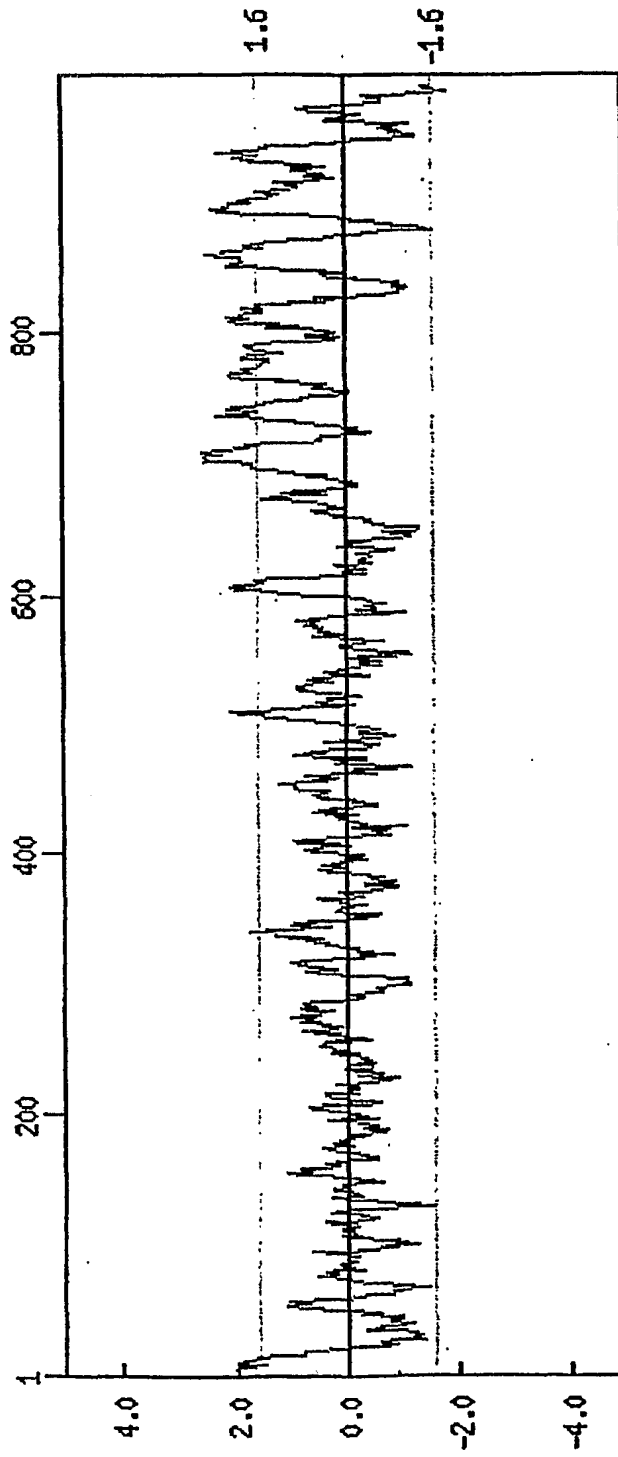
33. 哺乳動物に対して、請求項19、請求項28または請求項29記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系

疾患または感染症の予防・治療方法。

34. 中枢疾患、内分泌疾患、代謝疾患、癌、炎症性疾患、循環器系疾患、呼吸器系疾患、消化器系疾患、免疫系疾患または感染症の予防・治療剤を製造するための請求項19、請求項28または請求項29記載の化合物またはその塩の使用。

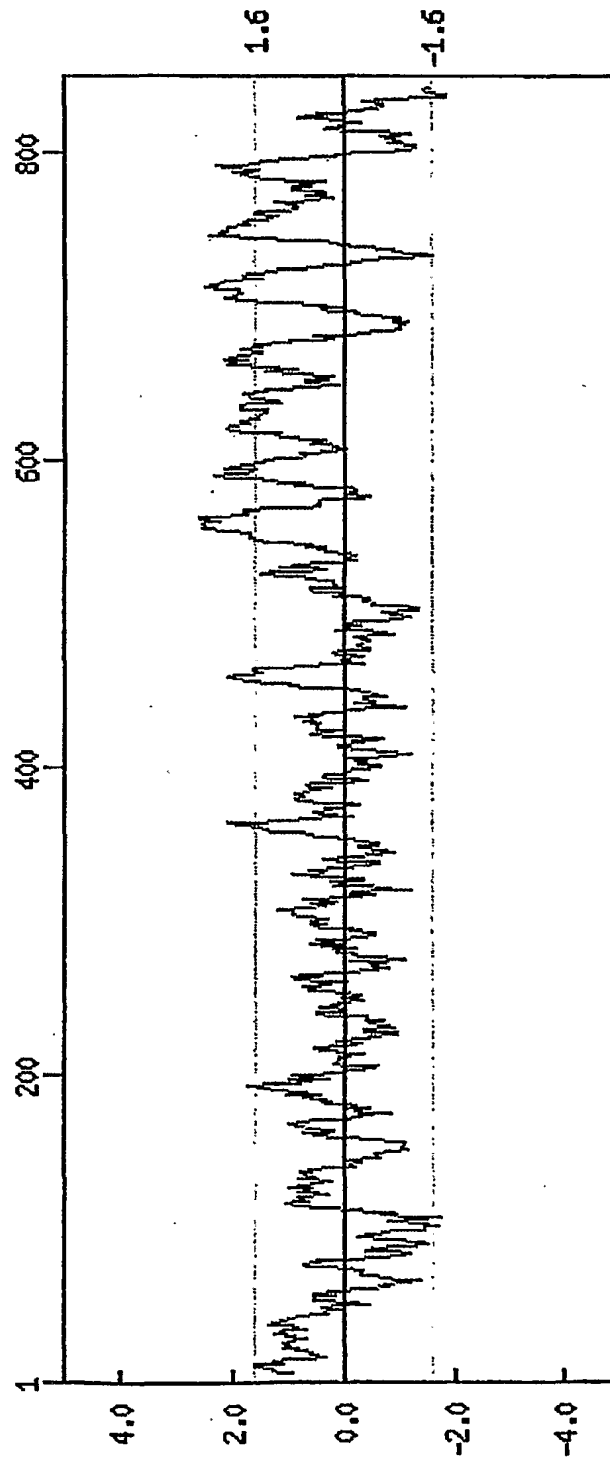
1 / 7

図 1



2 / 7

図 2



3 / 7

図 3

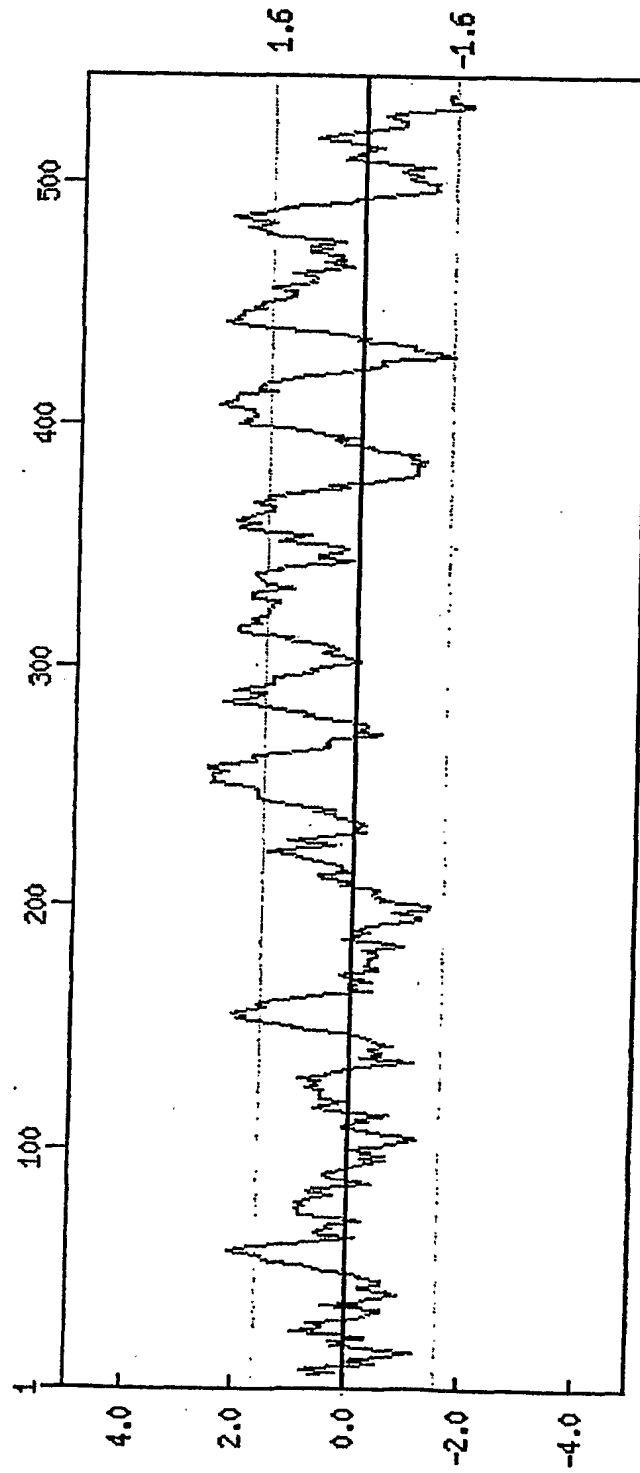
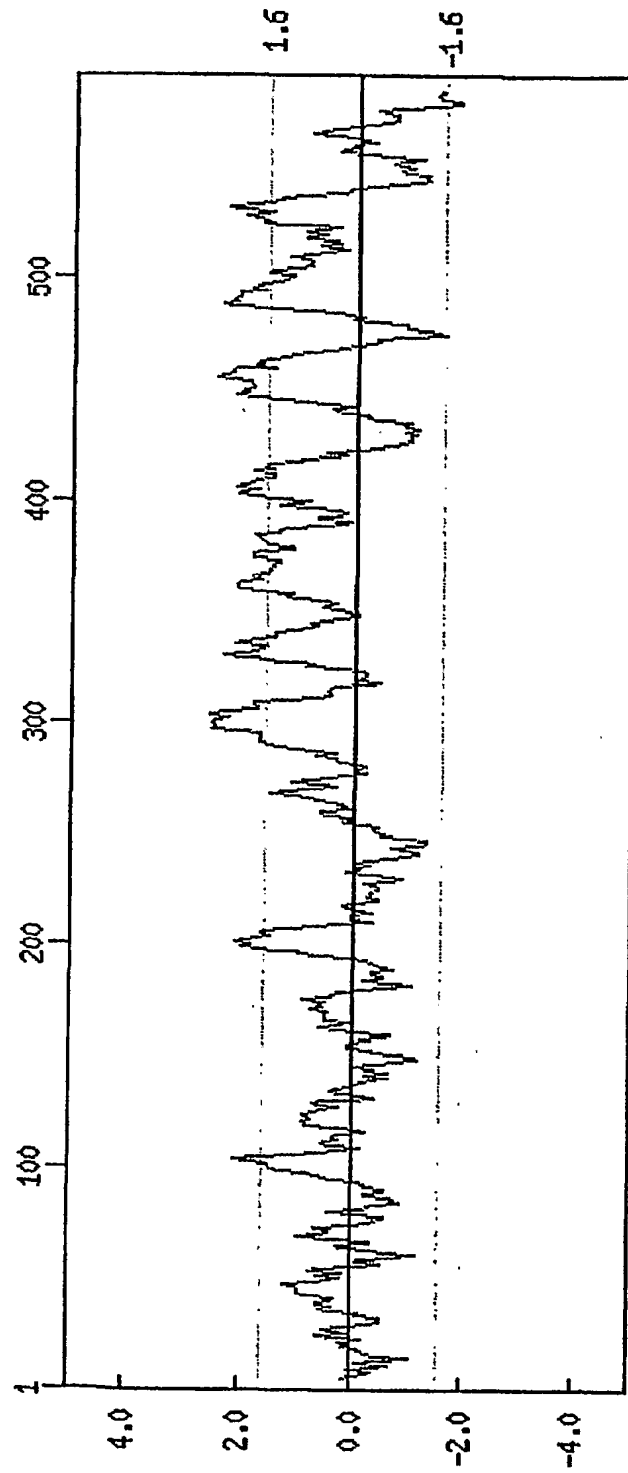


図 4



5 / 7

図 5

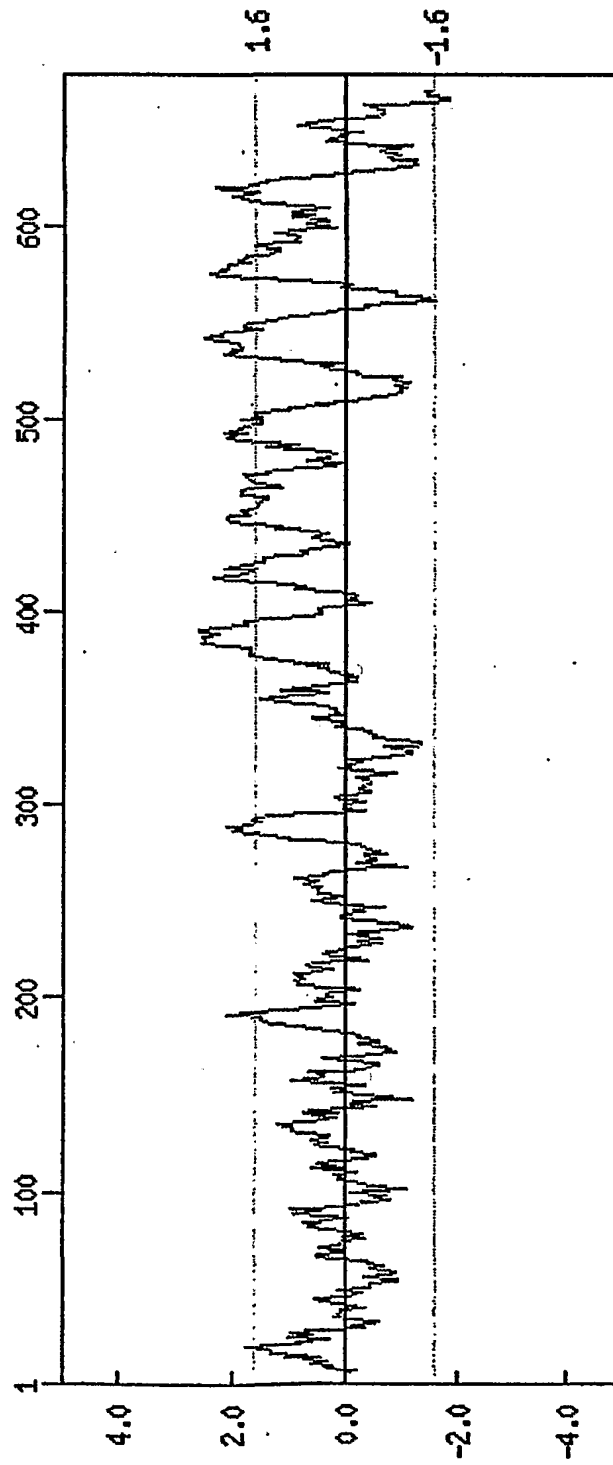
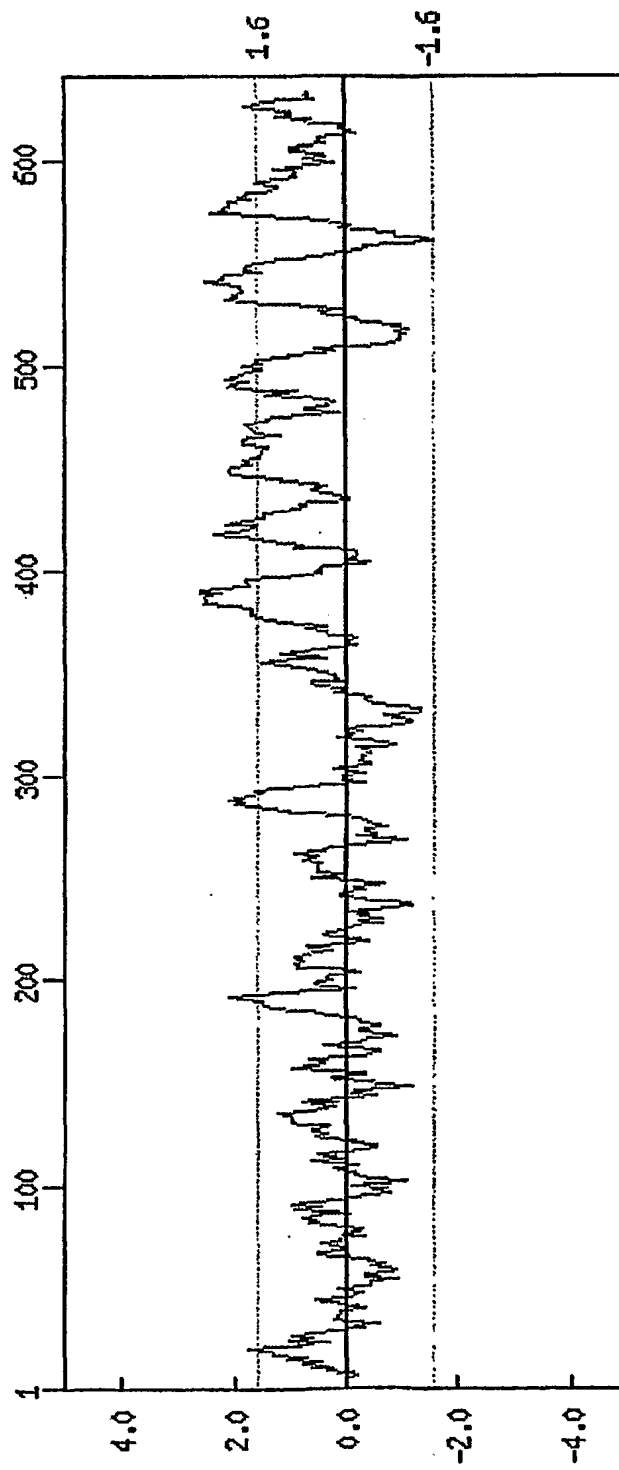


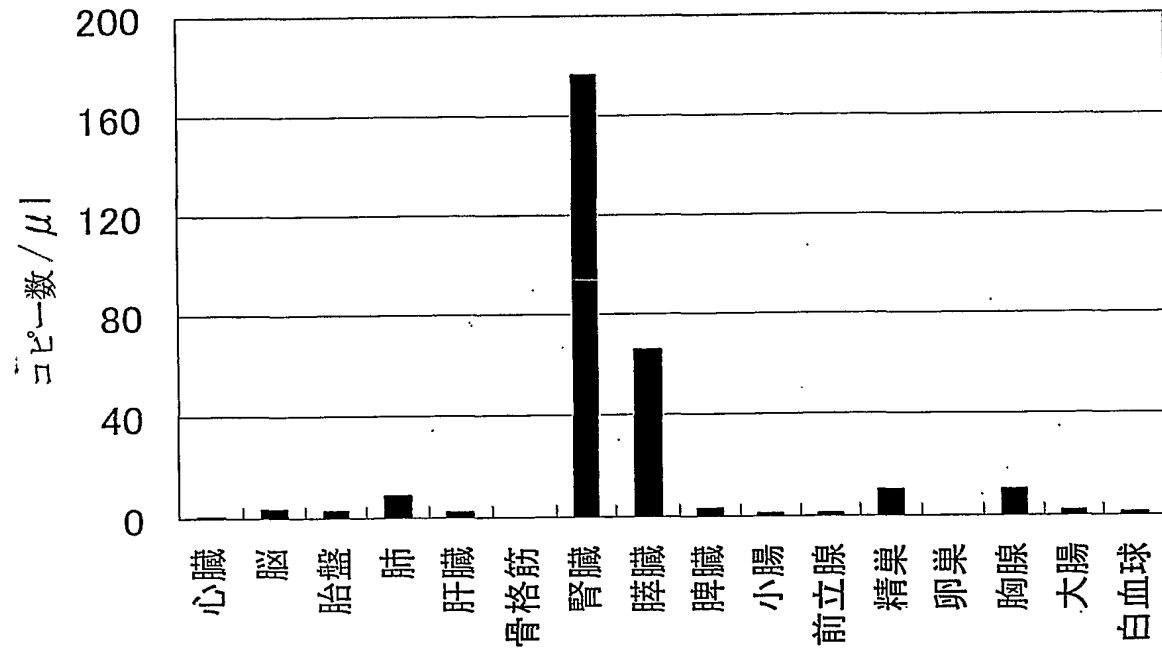
図 6





7 / 7

図 7



1/34

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Novel G Protein-Coupled Receptor and its DNA

&lt;130&gt; P01-0268PCT

&lt;150&gt; JP 2000-400625

&lt;151&gt; 2000-12-28

&lt;150&gt; JP 2001-115916

&lt;151&gt; 2001-04-13

&lt;160&gt; 22

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 994

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

Met Val Cys Ser Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Ala Thr Thr Leu Pro

5

10

15

Leu Leu Gly Ser Pro Val Ala Gln Ala Ser Gln Pro Gly Gln Ser Gln

20

25

30

Ala Gly Gly Glu Ser Gly Ser Gly Gln Leu Leu Asp Gln Glu Asn Gly

35

40

45

Ala Gly Glu Ser Ala Leu Val Ser Val Tyr Val His Leu Asp Phe Pro

50

55

60

Asp Lys Thr Trp Pro Pro Glu Leu Ser Arg Thr Leu Thr Leu Pro Ala

65

70

75

80

2/34

Ala Ser Ala Ser Ser Ser Pro Arg Pro Leu Leu Thr Gly Leu Arg Leu  
                             85                            90                            95  
 Thr Thr Glu Cys Asn Val Asn His Lys Gly Asn Phe Tyr Cys Ala Cys  
                             100                            105                            110  
 Leu Ser Gly Tyr Gln Trp Asn Thr Ser Ile Cys Leu His Tyr Pro Pro  
                             115                            120                            125  
 Cys Gln Ser Leu His Asn His Gln Pro Cys Gly Cys Leu Val Phe Ser  
                             130                            135                            140  
 His Pro Glu Pro Gly Tyr Cys Gln Leu Leu Pro Pro Val Pro Gly Ile  
                             145                            150                            155                            160  
 Leu Asn Leu Asn Ser Gln Leu Gln Met Pro Gly Asp Thr Leu Ser Leu  
                             165                            170                            175  
 Thr Leu His Leu Ser Gln Glu Ala Thr Asn Leu Ser Trp Phe Leu Arg  
                             180                            185                            190  
 His Pro Gly Ser Pro Ser Pro Ile Leu Leu Gln Pro Gly Thr Gln Val  
                             195                            200                            205  
 Ser Val Thr Ser Ser His Gly Gln Ala Ala Leu Ser Val Ser Asn Met  
                             210                            215                            220  
 Ser His His Trp Ala Gly Glu Tyr Met Ser Cys Phe Glu Ala Gln Gly  
                             225                            230                            235                            240  
 Phe Lys Trp Asn Leu Tyr Glu Val Val Arg Val Pro Leu Lys Ala Thr  
                             245                            250                            255  
 Asp Val Ala Arg Leu Pro Tyr Gln Leu Ser Ile Ser Cys Ala Thr Ser  
                             260                            265                            270  
 Pro Gly Phe Gln Leu Ser Cys Cys Ile Pro Ser Thr Asn Leu Ala Tyr  
                             275                            280                            285  
 Thr Ala Ala Trp Ser Pro Gly Glu Gly Ser Lys Ala Ser Ser Phe Asn  
                             290                            295                            300  
 Glu Ser Gly Ser Gln Cys Phe Val Leu Ala Val Gln Arg Cys Pro Met

3/34

305	310	315	320
Ala Asp Thr Thr Tyr Thr Cys Asp Leu Gln Ser Leu Gly Leu Ala Pro			
	325	330	335
Leu Arg Val Pro Ile Ser Ile Thr Ile Ile Gln Asp Gly Asp Ile Thr			
	340	345	350
Cys Pro Glu Asp Ala Ser Val Leu Thr Trp Asn Val Thr Lys Ala Gly			
	355	360	365
His Val Ala Gln Ala Pro Cys Pro Glu Ser Lys Arg Gly Ile Val Arg			
	370	375	380
Arg Leu Cys Gly Ala Asp Gly Val Trp Gly Pro Val His Ser Ser Cys			
385	390	395	400
Thr Asp Ala Arg Leu Leu Ala Leu Phe Thr Arg Thr Lys Leu Leu Gln			
	405	410	415
Ala Gly Gln Gly Ser Pro Ala Glu Glu Val Pro Gln Ile Leu Ala Gln			
	420	425	430
Leu Pro Gly Gln Ala Ala Glu Ala Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu Thr			
	435	440	445
Leu Leu Ser Thr Met Lys Tyr Val Ala Lys Val Val Ala Glu Ala Arg			
	450	455	460
Ile Gln Leu Asp Arg Arg Ala Leu Lys Asn Leu Leu Ile Ala Thr Asp			
465	470	475	480
Lys Val Leu Asp Met Asp Thr Arg Ser Leu Trp Thr Leu Ala Gln Ala			
	485	490	495
Arg Lys Pro Trp Ala Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ala Val Glu Thr Leu			
	500	505	510
Ala Cys Ser Leu Cys Pro Gln Asp Tyr Pro Phe Ala Phe Ser Leu Pro			
	515	520	525
Asn Val Leu Leu Gln Ser Gln Leu Phe Gly Pro Thr Phe Pro Ala Asp			
	530	535	540

4/34

Tyr Ser Ile Ser Phe Pro Thr Arg Pro Pro Leu Gln Ala Gln Ile Pro  
 545 550 555 560  
 Arg His Ser Leu Ala Pro Leu Val Arg Asn Gly Thr Glu Ile Ser Ile  
 565 570 575  
 Thr Ser Leu Val Leu Arg Lys Leu Asp His Leu Leu Pro Ser Asn Tyr  
 580 585 590  
 Gly Gln Gly Leu Gly Asp Ser Leu Tyr Ala Thr Pro Gly Leu Val Leu  
 595 600 605  
 Val Ile Ser Ile Met Ala Gly Asp Arg Ala Phe Ser Gln Gly Glu Val  
 610 615 620  
 Ile Met Asp Phe Gly Asn Thr Asp Gly Ser Pro His Cys Val Phe Trp  
 625 630 635 640  
 Asp His Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Trp Ser Lys Glu Gly Cys  
 645 650 655  
 Gln Ala Gln Val Ala Ser Ala Ser Pro Thr Ala Gln Cys Leu Cys Gln  
 660 665 670  
 His Leu Thr Ala Phe Ser Val Leu Met Ser Pro His Thr Val Pro Glu  
 675 680 685  
 Glu Pro Ala Leu Ala Leu Leu Thr Gln Val Gly Leu Gly Ala Ser Ile  
 690 695 700  
 Leu Ala Leu Leu Val Cys Leu Gly Val Tyr Trp Leu Val Trp Arg Val  
 705 710 715 720  
 Val Val Arg Asn Lys Ile Ser Tyr Phe Arg His Ala Ala Leu Leu Asn  
 725 730 735  
 Met Val Phe Cys Leu Leu Ala Ala Asp Thr Cys Phe Leu Gly Ala Pro  
 740 745 750  
 Phe Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ser Pro Leu Cys Leu Ala Ala Ala Phe  
 755 760 765  
 Leu Cys His Phe Leu Tyr Leu Ala Thr Phe Phe Trp Met Leu Ala Gln

5/34

770	775	780
Ala Leu Val Leu Ala His Gln Leu Leu Phe Val Phe His Gln Leu Ala		
785	790	795
Lys His Arg Val Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Tyr Leu Cys Pro		800
	805	810
Leu Gly Leu Ala Gly Val Thr Leu Gly Leu Tyr Leu Pro Gln Gly Gln		815
	820	825
Tyr Leu Arg Glu Gly Glu Cys Trp Leu Asp Gly Lys Gly Gly Ala Leu		830
	835	840
Tyr Thr Phe Val Gly Pro Val Leu Ala Ile Ile Gly Val Asn Gly Leu		845
	850	855
Val Leu Ala Met Ala Met Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser Glu		860
865	870	875
Gly Pro Pro Ala Glu Lys Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys Ala		880
	885	890
Leu Leu Ile Leu Thr Pro Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Leu		895
	900	905
Ala Thr Leu Leu Glu Glu Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe Thr		910
	915	920
Ile Leu Asn Thr Leu Gln Gly Val Phe Ile Leu Leu Phe Gly Cys Leu		925
	930	935
Met Asp Arg Lys Ile Gln Glu Ala Leu Arg Lys Arg Phe Cys Arg Ala		940
945	950	955
Gln Ala Pro Ser Ser Thr Ile Ser Leu Ala Thr Asn Glu Gly Cys Ile		960
	965	970
Leu Glu His Ser Lys Gly Gly Ser Asp Thr Ala Arg Lys Thr Asp Ala		975
	980	985
Ser Glu		990

6/34

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2982

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

```

atggtctgtt cggctgcccc actgctgctc ctggccacaa ctcttcccct gctgggggtca    60
ccagttgccc aagcatccca acctggacag agtcaggctg gaggggaatc tggatctggg    120
cagctcctgg accaagagaa tggagcaggg gaatcagcgc tggcttccgt ctatgtacat    180
ctggactttc cagataagac ctggccccct gaactctcca ggacactgac tctccctgct    240
gcctcagctt cctcttcccc aaggcctctt ctactggcc tcagactcac aacagagtgt    300
aatgtcaacc acaaggggaa tttctattgt gcttgccctc ctggctacca gtggaacacc    360
agcatctgcc tccattaccc tccttgtcaa agcctccaca accaccagcc ttgtggctgc    420
cttgctttca gccatcccgga acccggttac tgccagttgc tgccacctgt ccccgggatc    480
ctcaacctga actcccagct gcagatgcct ggtgacacgc tgagcctgac tctccatctg    540
agccaggagg ccaccaacct gagctggttc ctgaggcacc caggagagccc cagtcccatc    600
ctcctgcagc caggacaca ggtgtctgtg acttccagcc acggccaggc tgccctcagc    660
gtctccaaca tgtcccatca ctgggcaggt gagtacatga gctgcttcga ggcccagggc    720
ttcaagtgga acctgtatga ggtggtgagg gtgcccttga aggcgacaga tgtggctcga    780
cttccatacc agctgtccat ctctgtgcc acctccccctg gcttccagct gagctgtctgc    840
atccccagca caaacctggc ctacaccgcg gcctggagcc ctggagaggg cagcaaagct    900
tcctccttca acgagtcagg ctctcagtgc tttgtgctgg ctgttcagcg ctgcccgatg    960
gctgacacca cgtacacttg tgacctgcag agcctgggcc tggctccact cagggtcccc   1020
atctccatca ccatcatcca ggatggagac atcacctgcc ctgaggacgc ctcggtgctc   1080
acctggaatg tcaccaaggc tggccacgtg gcacaggccc catgtcctga gagcaagagg   1140
ggcatagtga ggaggctctg tggggctgac ggagtctggg ggccgggtcca cagcagctgc   1200
acagatgcga ggctcctggc .cttgttcact agaaccaagc tgctgcaggc aggccagggc   1260
agtcctgctg aggaggtgcc acagatcctg gcacagctgc cagggcaggc ggcagaggca   1320
agttcacct ccgacttact gaccctgctg agcaccatga aatacgtggc caaggtggtg   1380

```

7/34

gcagaggcca gaatacagct tgaccgcaga gccctgaaga atctcctgat tgccacagac 1440  
aaggtcctag atatggacac caggtctctg tggaccctgg cccaagcccc gaagccctgg 1500  
gcaggctcga ctctcctgct ggctgtggag accctggcat gcagcctgtg cccacaggac 1560  
tacccttctg ccttcagctt acccaatgtg ctgctgcaga gccagctgtt tggaccacag 1620  
tttctgtctg actacagcat ctcttccctt actcggtccc cactgcagge tcagattccc 1680  
aggcactcac tggccccatt ggtccgtaat ggaactgaaa taagtattac tagcctgggtg 1740  
ctgcgaaaac tggaccacct tctgccctca aactatggac aagggtctggg ggattccctc 1800  
tatgccactc ctggcctggg ccttgtcatt tccatcatgg caggtagacc ggccttcagc 1860  
caggagagg tcatcatgga ctttgggaac acagatggtt cccctcactg tgtcttctgg 1920  
gatcacagtc tcttccaggg caggggggggt tgggtccaaag aagggtgcca ggcacagggtg 1980  
gccagtcca gccccactgc tcagtgcctc tgccagcacc tcaactgcctt ctccgtcctc 2040  
atgtccccc acactgttcc ggaagaacct gctctggcgc tgcctgactca agtgggcttg 2100  
ggagcttcca tactggcgct gcttgtgtgc ctgggtgtgt actggctggg gtggagagtc 2160  
gtggtgcgga acaagatctc ctatttccgc cagcgcgcc tgctcaacat ggtgttctgc 2220  
ttgttgccg cagacacttg ctctctgggc gcccattcc tctctccagg gcccgaagc 2280  
ccgtctgcc ttgttgccgc ctctctctgt catttctctt acctggccac ctttttctgg 2340  
atgttgccgc aggccttggg gttggccac cagctgctct ttgtcttcca ccagctggca 2400  
aagcaccgag ttctccccct catgggtgct ctgggtacc tgtgcccact ggggttggca 2460  
ggtgtcacc tggggctcta cctacctcaa gggcaatacc tgaggaggagg ggaatgctgg 2520  
ttgatggga agggaggggc gttatacacc ttcgtggggc cagtgtggc catcataggc 2580  
gtgaatgggc tggtagtagc catggccatg ctgaagtgtc tgagaccctt gctgtcagag 2640  
ggacccccag cagagaagcg ccaagctctg ctgggggtga tcaaagccct gctcattctt 2700  
acacccatct ttggcctcac ctgggggtg ggcctggcca ctctgttaga ggaagtctcc 2760  
acgttccctt attacatctt caccattctc aacaccctcc agggcgtctt cactctattg 2820  
tttggttggc tcatggacag gaagatacaa gaagctttgc gcaaacgctt ctgccgcgcc 2880  
caagccccca gctccacat ctccctggcc acaaataag gctgcatctt ggaacacagc 2940  
aaaggaggaa gcgacactgc caggaagaca gatgcttcag ag 2982



8/34

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding hTGR21-1

&lt;400&gt; 3

gtcgacatgg tctgttcggc tgccccactg c 31

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding hTGR21-1, hTGR21-2, hTGR21-3, hTGR21-4 and hTGR21-5

&lt;400&gt; 4

tactagttca ctctgaagca tctgtcttcc tg 32

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 847

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

9/34

Met Ser Thr Thr Arg Gly Ile Ser Ile Val Leu Ala Ser Leu Ala Thr  
                     5                    10                    15  
 Ser Gly Thr Pro Ala Ser Ala Ser Ile Thr Leu Leu Val Lys Ala Ser  
                     20                    25                    30  
 Thr Thr Thr Ser Leu Val Ala Ala Leu Ser Ser Ala Ile Pro Asn Pro  
                     35                    40                    45  
 Gly Thr Ala Ser Cys Cys His Leu Lys Ser Phe Leu Gly Thr Gly Asn  
                     50                    55                    60  
 Val His Gln Arg Gly His Pro Gly Thr Leu Leu Ala Gly Val Lys His  
                     65                    70                    75                    80  
 Trp Val Ala Gly Arg Gly Gln Glu Gln Gly Cys Gly Leu Glu Ser Ser  
                     85                    90                    95  
 Arg Asp Ser Val Val Gln Arg Gly Pro Glu Glu Pro His Ser Ala Ala  
                     100                    105                    110  
 His Thr Cys Leu Gln Leu Ser Ile Ser Cys Ala Thr Ser Pro Gly Phe  
                     115                    120                    125  
 Gln Leu Ser Cys Cys Ile Pro Ser Thr Asn Leu Ala Tyr Thr Ala Ala  
                     130                    135                    140  
 Trp Ser Pro Gly Glu Gly Ser Lys Ala Ser Ser Phe Asn Glu Ser Gly  
                     145                    150                    155                    160  
 Ser Gln Cys Phe Val Leu Ala Val Gln Arg Cys Pro Met Ala Asp Thr  
                     165                    170                    175  
 Thr Tyr Thr Cys Asp Leu Gln Ser Leu Gly Leu Ala Pro Leu Arg Val  
                     180                    185                    190  
 Pro Ile Ser Ile Thr Ile Ile Gln Asp Gly Asp Ile Thr Cys Pro Glu  
                     195                    200                    205  
 Asp Ala Ser Val Leu Thr Trp Asn Val Thr Lys Ala Gly His Val Ala  
                     210                    215                    220  
 Gln Ala Pro Cys Pro Glu Ser Lys Arg Gly Ile Val Arg Arg Leu Cys

10/34

225	230	235	240
Gly Ala Asp Gly Val Trp Gly Pro Val His Ser Ser Cys Thr Asp Ala			
	245	250	255
Arg Leu Leu Ala Leu Phe Thr Arg Thr Lys Leu Leu Gln Ala Gly Gln			
	260	265	270
Gly Ser Pro Ala Glu Glu Val Pro Gln Ile Leu Ala Gln Leu Pro Gly			
	275	280	285
Gln Ala Ala Glu Ala Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu Thr Leu Leu Ser			
	290	295	300
Thr Met Lys Tyr Val Ala Lys Val Val Ala Glu Ala Arg Ile Gln Leu			
305	310	315	320
Asp Arg Arg Ala Leu Lys Asn Leu Leu Ile Ala Thr Asp Lys Val Leu			
	325	330	335
Asp Met Asp Thr Arg Ser Leu Trp Thr Leu Ala Gln Ala Arg Lys Pro			
	340	345	350
Trp Ala Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ala Val Glu Thr Leu Ala Cys Ser			
	355	360	365
Leu Cys Pro Gln Asp Tyr Pro Phe Ala Phe Ser Leu Pro Asn Val Leu			
	370	375	380
Leu Gln Ser Gln Leu Phe Gly Pro Thr Phe Pro Ala Asp Tyr Ser Ile			
385	390	395	400
Ser Phe Pro Thr Arg Pro Pro Leu Gln Ala Gln Ile Pro Arg His Ser			
	405	410	415
Leu Ala Pro Leu Val Arg Asn Gly Thr Glu Ile Ser Ile Thr Ser Leu			
	420	425	430
Val Leu Arg Lys Leu Asp His Leu Leu Pro Ser Asn Tyr Gly Gln Gly			
	435	440	445
Leu Gly Asp Ser Leu Tyr Ala Thr Pro Gly Leu Val Leu Val Ile Ser			
	450	455	460

11/34

Ile Met Ala Gly Asp Arg Ala Phe Ser Gln Gly Glu Val Ile Met Asp			
465	470	475	480
Phe Gly Asn Thr Asp Gly Ser Pro His Cys Val Phe Trp Asp His Ser			
	485	490	495
Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Trp Ser Lys Glu Gly Cys Gln Ala Gln			
	500	505	510
Val Ala Ser Ala Ser Pro Thr Ala Gln Cys Leu Cys Gln His Leu Thr			
	515	520	525
Ala Phe Ser Val Leu Met Ser Pro His Thr Val Pro Glu Glu Pro Ala			
	530	535	540
Leu Ala Leu Leu Thr Gln Val Gly Leu Gly Ala Ser Ile Leu Ala Leu			
545	550	555	560
Leu Val Cys Leu Gly Val Tyr Trp Leu Val Trp Arg Val Val Val Arg			
	565	570	575
Asn Lys Ile Ser Tyr Phe Arg His Ala Ala Leu Leu Asn Met Val Phe			
	580	585	590
Cys Leu Leu Ala Ala Asp Thr Cys Phe Leu Gly Ala Pro Phe Leu Ser			
	595	600	605
Pro Gly Pro Arg Ser Pro Leu Cys Leu Ala Ala Ala Phe Leu Cys His			
	610	615	620
Phe Leu Tyr Leu Ala Thr Phe Phe Trp Met Leu Ala Gln Ala Leu Val			
625	630	635	640
Leu Ala His Gln Leu Leu Phe Val Phe His Gln Leu Ala Lys His Arg			
	645	650	655
Val Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Tyr Leu Cys Pro Leu Gly Leu			
	660	665	670
Ala Gly Val Thr Leu Gly Leu Tyr Leu Pro Gln Gly Gln Tyr Leu Arg			
	675	680	685
Glu Gly Glu Cys Trp Leu Asp Gly Lys Gly Gly Ala Leu Tyr Thr Phe			

12/34

690	695	700
Val Gly Pro Val Leu Ala Ile Ile Gly Val Asn Gly Leu Val Leu Ala		
705	710	715
Met Ala Met Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser Glu Gly Pro Pro		
	725	730
		735
Ala Glu Lys Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys Ala Leu Leu Ile		
	740	745
		750
Leu Thr Pro Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Leu Ala Thr Leu		
	755	760
		765
Leu Glu Glu Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe Thr Ile Leu Asn		
	770	775
		780
Thr Leu Gln Gly Val Phe Ile Leu Leu Phe Gly Cys Leu Met Asp Arg		
785	790	795
		800
Lys Ile Gln Glu Ala Leu Arg Lys Arg Phe Cys Arg Ala Gln Ala Pro		
	805	810
		815
Ser Ser Thr Ile Ser Leu Ala Thr Asn Glu Gly Cys Ile Leu Glu His		
	820	825
		830
Ser Lys Gly Gly Ser Asp Thr Ala Arg Lys Thr Asp Ala Ser Glu		
	835	840
		845

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 2541

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

atgtcaacca caaggggaat ttctattgtg cttgcctctc tggctaccag tggaacacca	60
gcattctgcct ccattaccct ccttggtcaaa gcctccacaa ccaccagcct tgtggctgcc	120

13/34

ttgtcttcag	ccatcccgaa	cccgggtact	gccagttgct	gccacctgaa	atccttcttg	180
gggacagggga	atgtccacca	aaggggccat	cctgggacct	tgcttgctgg	gtttaagcac	240
tgggtggcag	gcagaggaca	ggagcaaggc	tgtggcttgg	aaagcagcag	agattctgtg	300
gtgcagcggg	gcccagagga	gccacatagc	gccgcacaca	cgtgtctgca	gctgtccatc	360
tcctgtgcca	cctccccctgg	cttccagctg	agctgctgca	tccccagcac	aaacctggcc	420
tacaccgcgg	cctggagccc	tggagagggc	agcaaagcct	cctccttcaa	cgagtcaggc	480
tctcagtgtc	ttgtgctggc	tgttcagcgc	tgcccgatgg	ctgacaccac	gtacacttgt	540
gacctgcaga	gcctgggcct	ggctccactc	agggtcccca	tctccatcac	catcatccag	600
gatggagaca	tcacctgccc	tgaggacgcc	tgggtgctca	cctggaatgt	caccaaggct	660
ggccacgtgg	cacaggcccc	atgtcctgag	agcaagaggg	gcatagttag	gaggctctgt	720
ggggctgacg	gagtcctggg	gccggtccac	agcagctgca	cagatgcgag	gctcctggcc	780
ttgttcaacta	gaaccaagct	gctgcaggca	ggccagggca	gtcctgctga	ggaggtgcca	840
cagatcctgg	cacagctgcc	agggcaggcg	gcagaggcaa	gttcaccctc	cgacttactg	900
accttgctga	gcaccatgaa	atacgtggcc	aaggctgggg	cagaggccag	aatacagctt	960
gaccgcagag	cccigaagaa	tctcctgatt	gccacagaca	aggctcctaga	tatggacacc	1020
aggctctctgt	ggaccttggc	ccaagcccgg	aagccctggg	caggctcgac	tctcctgctg	1080
gctgtggaga	ccctggcatg	cagcctgtgc	ccacaggact	accccttcgc	cttcagctta	1140
cccaatgtgc	tgctgcagag	ccagctgttt	ggaccacagt	ttcctgtgta	ctacagcatc	1200
tccttcccta	ctcggccccc	actgcaggct	cagattccca	ggcactcact	ggccccattg	1260
gtccgtaatg	gaactgaaat	aagtattact	agcctgggtg	tgcgaaaact	ggaccacctt	1320
ctgccctcaa	actatggaca	agggttgggg	gattccctct	atgccactcc	tggcctggtc	1380
cttgtcattt	ccatcatggc	aggtgaccgg	gccttcagcc	aggagagagt	catcatggac	1440
tttggaaca	cagatggttc	ccctcactgt	gtcttctggg	atcacagtct	cttccagggc	1500
aggggggggt	ggtccaaaga	agggtgccag	gcacagggtg	ccagtgccag	ccccactgct	1560
cagtgcctct	gccagcacct	cactgccttc	tccgtcctca	tgtccccaca	cactgttccg	1620
gaagaacccg	ctctggcgct	gctgactcaa	gtgggcttgg	gagcttccat	actggcgctg	1680
cttgtgtgcc	tgggtgtgta	ctggctgggtg	tggagagtcg	tgggtcgga	caagatctcc	1740
tatttccgcc	acgccgccct	gctcaacatg	gtgttctgtc	tgctggccgc	agacacttgc	1800
tctctgggcg	ccccattcct	ctctccaggg	ccccgaagcc	cgctctgcct	tgctgccgcc	1860

14/34

```

ttcctctgtc atttcttcta cctggccacc tttttctgga tgctggcgca ggccctgggtg 1920
ttggccacc agctgtcttt tgtctttcac cagctggcaa agcaccgagt tctccccctc 1980
atgggtgctcc tgggctacct gtgcccactg gggttggcag gtgtcacctt ggggctctac 2040
ctacctcaag ggcaataacct gagggagggg gaatgctggt tggatgggaa gggaggggagc 2100
ttatacacct tcgtggggcc agtgctggcc atcataggcg tgaatgggct ggtactagcc 2160
atggccaatgc tgaagttagct gagaccttcg ctgtcagagg gacccccagc agagaagcgc 2220
caagctctgc tgggggtgat caaagccctg ctcatctta cacccatctt tggcctcacc 2280
tgggggctgg gcctggccac tctgttagag gaagtctcca cggtcctca ttacatcttc 2340
accattctca acaccctcca gggcgtcttc atcctattgt ttggttgctt catggacagg 2400
aagatacaag aagctttgcg caaacgttc tgccgcgccc aagccccag ctccaccatc 2460
tccctggcca caaatgaagg ctgcatcttg gaacacagca aaggaggaag cgacactgcc 2520
aggaagacag atgcttcaga g 2541

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding hTGR21-2

&lt;400&gt; 7

```

gtcgacatgt caaccacaag gggaatttct at 32

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 542

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

15/34

&lt;400&gt; 8

Met	Lys	Tyr	Val	Ala	Lys	Val	Val	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Gln	Leu	Asp
					5					10				15	
Arg	Arg	Ala	Leu	Lys	Asn	Leu	Leu	Ile	Ala	Thr	Asp	Lys	Val	Leu	Asp
			20					25						30	
Met	Asp	Thr	Arg	Ser	Leu	Trp	Thr	Leu	Ala	Gln	Ala	Arg	Lys	Pro	Trp
			35					40						45	
Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Glu	Thr	Leu	Ala	Cys	Ser	Leu
			50					55						60	
Cys	Pro	Gln	Asp	Tyr	Pro	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Pro	Asn	Val	Leu	Leu
			65				70				75			80	
Gln	Ser	Gln	Leu	Phe	Gly	Pro	Thr	Phe	Pro	Ala	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ser
							85				90			95	
Phe	Pro	Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Gln	Ala	Gln	Ile	Pro	Arg	His	Ser	Leu
							100				105			110	
Ala	Pro	Leu	Val	Arg	Asn	Gly	Thr	Glu	Ile	Ser	Ile	Thr	Ser	Leu	Val
							115				120			125	
Leu	Arg	Lys	Leu	Asp	His	Leu	Leu	Pro	Ser	Asn	Tyr	Gly	Gln	Gly	Leu
							130				135			140	
Gly	Asp	Ser	Leu	Tyr	Ala	Thr	Pro	Gly	Leu	Val	Leu	Val	Ile	Ser	Ile
							145				150			155	
Met	Ala	Gly	Asp	Arg	Ala	Phe	Ser	Gln	Gly	Glu	Val	Ile	Met	Asp	Phe
							165				170			175	
Gly	Asn	Thr	Asp	Gly	Ser	Pro	His	Cys	Val	Phe	Trp	Asp	His	Ser	Leu
							180				185			190	
Phe	Gln	Gly	Arg	Gly	Gly	Trp	Ser	Lys	Glu	Gly	Cys	Gln	Ala	Gln	Val
							195				200			205	
Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Thr	Ala	Gln	Cys	Leu	Cys	Gln	His	Leu	Thr	Ala
							210				215			220	



16/34

Phe Ser Val Leu Met Ser Pro His Thr Val Pro Glu Glu Pro Ala Leu  
 225                      230                      235                      240  
 Ala Leu Leu Thr Gln Val Gly Leu Gly Ala Ser Ile Leu Ala Leu Leu  
                     245                      250                      255  
 Val Cys Leu Gly Val Tyr Trp Leu Val Trp Arg Val Val Val Arg Asn  
                     260                      265                      270  
 Lys Ile Ser Tyr Phe Arg His Ala Ala Leu Leu Asn Met Val Phe Cys  
                     275                      280                      285  
 Leu Leu Ala Ala Asp Thr Cys Phe Leu Gly Ala Pro Phe Leu Ser Pro  
                     290                      295                      300  
 Gly Pro Arg Ser Pro Leu Cys Leu Ala Ala Ala Phe Leu Cys His Phe  
 305                      310                      315                      320  
 Leu Tyr Leu Ala Thr Phe Phe Trp Met Leu Ala Gln Ala Leu Val Leu  
                     325                      330                      335  
 Ala His Gln Leu Leu Phe Val Phe His Gln Leu Ala Lys His Arg Val  
                     340                      345                      350  
 Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Tyr Leu Cys Pro Leu Gly Leu Ala  
                     355                      360                      365  
 Gly Val Thr Leu Gly Leu Tyr Leu Pro Gln Gly Gln Tyr Leu Arg Glu  
                     370                      375                      380  
 Gly Glu Cys Trp Leu Asp Gly Lys Gly Gly Ala Leu Tyr Thr Phe Val  
 385                      390                      395                      400  
 Gly Pro Val Leu Ala Ile Ile Gly Val Asn Gly Leu Val Leu Ala Met  
                     405                      410                      415  
 Ala Met Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser Glu Gly Pro Pro Ala  
                     420                      425                      430  
 Glu Lys Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys Ala Leu Leu Ile Leu  
                     435                      440                      445  
 Thr Pro Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Leu Ala Thr Leu Leu

17/34

450	455	460	
Glu Glu Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe Thr Ile Leu Asn Thr			
465	470	475	480
Leu Gln Gly Val Phe Ile Leu Leu Phe Gly Cys Leu Met Asp Arg Lys			
	485	490	495
Ile Gln Glu Ala Leu Arg Lys Arg Phe Cys Arg Ala Gln Ala Pro Ser			
	500	505	510
Ser Thr Ile Ser Leu Ala Thr Asn Glu Gly Cys Ile Leu Glu His Ser			
	515	520	525
Lys Gly Gly Ser Asp Thr Ala Arg Lys Thr Asp Ala Ser Glu			
530	535	540	

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1626

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 9

atgaaatacgtggccaaggtggtggcagag gccagaatac agcttgaccg cagagccctg	60
aagaatctcttgattgccac agacaaggctc ctagatatgg acaccaggctc tctgtggacc	120
ctggcccaag cccggaagcc ctgggcaggc tgcactctcc tgctggctgt ggagaccctg	180
gcatgcagcc tgtgcccaca ggactacccc ttgccttca gcttaccaa tgtgctgctg	240
cagagccagc tgittggacc cacgtttcct gctgactaca gcatctcctt ccctactcgg	300
ccccactgc aggctcagat tcccaggcac tcaactggccc catttgtccg taatggaact	360
gaaataagta ttactagcct ggtgctgcga aaactggacc accttctgcc ctcaaactat	420
ggacaagggc tgggggattc cctctatgcc actcctggcc tggtccttgt catttccatc	480
atggcaggctg accgggcctt cagccaggga gaggtcatca tggacttttg gaacacagat	540
ggttccccctc actgtgtctt ctgggatcac agtctcttcc agggcagggg gggtttggtcc	600
aaagaagggt gccaggcaca ggtggccagt gccagcccca ctgctcagtg cctctgccag	660

18/34

```

cacctcactg ccttctccgt cctcatgtcc ccacacactg ttccggaaga acccgctctg 720
gcgctgctga ctcaagtggg ctggggagct tccatactgg cgctgcttgt gtgcctgggt 780
gtgtactggc tgggtgggag agtcgtgggt cggaacaaga tctcctatct cggccacgcc 840
gccctgctca acatgggtgt ctgcttgctg gccgcagaca ctgcttcct gggcgcccca 900
ttcctctctc cagggccccc aagcccgctc tgccttgctg ccgcttcct ctgtcatttc 960
ctctacctgg ccaccttttt ctggatgctg gcgcaggccc tgggtttggc ccaccagctg 1020
ctctttgtct ttaccagct ggcaaagcac cgagttctcc cctcatggt gctcctgggc 1080
tacctgtgcc cactgggggt ggcaggtgtc accctggggc tctacctacc tcaagggcaa 1140
tacctgaggg agggggaatg ctggttgat gggaaggag gggcgttata caccttcgtg 1200
gggccagtgc tggccatcat aggcgtgaat ggcctggtag tagccatggc catgctgaag 1260
ttgctgagac ctctgctgtc agagggaccc ccagcagaga agcgccaagc tctgctgggg 1320
gtgatcaaag cctgctcat tcttacacc atctttggcc tcacctgggg gctgggcctg 1380
gccactctgt tagaggaagt ctccacggtc cctcattaca tcttcacat tctcaacacc 1440
ctccagggcg tcttcatect attgtttggt tgcctcatgg acaggaagat acaagaagct 1500
ttgcgcaaac gcttctgccg cgcccaagcc ccagctcca ccatctccct ggccacaaat 1560
gaaggctgca tcttgggaaca cagcaaagga ggaagcgaca ctgccaggaa gacagatgct 1620
tcagag 1626

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding hTGR21-3

&lt;400&gt; 10

gtcgacatga aatacgtggc caaggtgggtg g

31

19/34

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 588

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 11

```

Met Leu Ser Arg Leu Ser Gln Leu Leu Gln Ala Gly Gln Gly Ser Pro
      5              10              15
Ala Glu Glu Val Pro Gln Ile Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gln Ala Ala
      20              25              30
Glu Ala Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu Thr Leu Leu Ser Thr Met Lys
      35              40              45
Tyr Val Ala Lys Val Val Ala Glu Ala Arg Ile Gln Leu Asp Arg Arg
      50              55              60
Ala Leu Lys Asn Leu Leu Ile Ala Thr Asp Lys Val Leu Asp Met Asp
      65              70              75              80
Thr Arg Ser Leu Trp Thr Leu Ala Gln Ala Arg Lys Pro Trp Ala Gly
      85              90              95
Ser Thr Leu Leu Leu Ala Val Glu Thr Leu Ala Cys Ser Leu Cys Pro
      100             105             110
Gln Asp Tyr Pro Phe Ala Phe Ser Leu Pro Asn Val Leu Leu Gln Ser
      115             120             125
Gln Leu Phe Gly Pro Thr Phe Pro Ala Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Pro
      130             135             140
Thr Arg Pro Pro Leu Gln Ala Gln Ile Pro Arg His Ser Leu Ala Pro
      145             150             155             160
Leu Val Arg Asn Gly Thr Glu Ile Ser Ile Thr Ser Leu Val Leu Arg
      165             170             175
Lys Leu Asp His Leu Leu Pro Ser Asn Tyr Gly Gln Gly Leu Gly Asp

```

20/34

180	185	190
Ser Leu Tyr Ala Thr Pro Gly Leu Val Leu Val Ile Ser Ile Met Ala		
195	200	205
Gly Asp Arg Ala Phe Ser Gln Gly Glu Val Ile Met Asp Phe Gly Asn		
210	215	220
Thr Asp Gly Ser Pro His Cys Val Phe Trp Asp His Ser Leu Phe Gln		
225	230	235
Gly Arg Gly Gly Trp Ser Lys Glu Gly Cys Gln Ala Gln Val Ala Ser		
245	250	255
Ala Ser Pro Thr Ala Gln Cys Leu Cys Gln His Leu Thr Ala Phe Ser		
260	265	270
Val Leu Met Ser Pro His Thr Val Pro Glu Glu Pro Ala Leu Ala Leu		
275	280	285
Leu Thr Gln Val Gly Leu Gly Ala Ser Ile Leu Ala Leu Leu Val Cys		
290	295	300
Leu Gly Val Tyr Trp Leu Val Trp Arg Val Val Val Arg Asn Lys Ile		
305	310	315
Ser Tyr Phe Arg His Ala Ala Leu Leu Asn Met Val Phe Cys Leu Leu		
325	330	335
Ala Ala Asp Thr Cys Phe Leu Gly Ala Pro Phe Leu Ser Pro Gly Pro		
340	345	350
Arg Ser Pro Leu Cys Leu Ala Ala Ala Phe Leu Cys His Phe Leu Tyr		
355	360	365
Leu Ala Thr Phe Phe Trp Met Leu Ala Gln Ala Leu Val Leu Ala His		
370	375	380
Gln Leu Leu Phe Val Phe His Gln Leu Ala Lys His Arg Val Leu Pro		
385	390	395
Leu Met Val Leu Leu Gly Tyr Leu Cys Pro Leu Gly Leu Ala Gly Val		
405	410	415

21/34

Thr Leu Gly Leu Tyr Leu Pro Gln Gly Gln Tyr Leu Arg Glu Gly Glu  
 420 425 430  
 Cys Trp Leu Asp Gly Lys Gly Gly Ala Leu Tyr Thr Phe Val Gly Pro  
 435 440 445  
 Val Leu Ala Ile Ile Gly Val Asn Gly Leu Val Leu Ala Met Ala Met  
 450 455 460  
 Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser Glu Gly Pro Pro Ala Glu Lys  
 465 470 475 480  
 Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys Ala Leu Leu Ile Leu Thr Pro  
 485 490 495  
 Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Leu Ala Thr Leu Leu Glu Glu  
 500 505 510  
 Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe Thr Ile Leu Asn Thr Leu Gln  
 515 520 525  
 Gly Val Phe Ile Leu Leu Phe Gly Cys Leu Met Asp Arg Lys Ile Gln  
 530 535 540  
 Glu Ala Leu Arg Lys Arg Phe Cys Arg Ala Gln Ala Pro Ser Ser Thr  
 545 550 555 560  
 Ile Ser Leu Ala Thr Asn Glu Gly Cys Ile Leu Glu His Ser Lys Gly  
 565 570 575  
 Gly Ser Asp Thr Ala Arg Lys Thr Asp Ala Ser Glu  
 580 585

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 1764

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 12

22/34

atgctgtctc gctgtgtctca gctgtgtgcag gcaggccagg gcagtcctgc tgaggaggtg	60
ccacagatcc tggcacagct gccaggggcag gcggcagagg caagttcacc ctccgactta	120
ctgacctgctc tgagcaccat gaaatacgtg gccaaaggtgg tggcagaggc cagaatacag	180
cttgaccgca gagccctgaa gaatctcctg attgccacag acaaggctcct agatatggac	240
accaggtctc tgttgaccct ggcccaagcc cggaagccct gggcaggctc gactctcctg	300
ctggctgtgg agacctggc atgcagcctg tgcccacagg actaccctt cgccttcagc	360
ttaccaatg tgcgtgtgca gagccagctg tttggacca cgtttcctgc tgactacagc	420
atctccttcc ctactcggcc cccactgcag gctcagattc ccaggcactc actggcccca	480
ttggctccgta atggaactga aataagtatt actagcctgg tgctgcgaaa actggaccac	540
cttctgccct caaactatgg acaagggctg ggggattccc tctatgccac tcctggcctg	600
gtccttgtca ttcccatcat ggcagggtgac cgggccttca gccagggaga ggtcatcatg	660
gactttggga acacagatgg ttcccctcac tgtgtcttct gggatcacag tctcttcag	720
ggcagggggg gttggtccaa agaagggtgc caggcacagg tggccagtgc cagccccact	780
gctcagtgcc tctgccagca cctcactgcc ttctccgtcc tcatgtcccc acacactgtt	840
ccggaagaac ccgctctggc gctgtgact caagtgggct tgggagcttc catactggcg	900
ctgcttgtgt gcctgggtgt gtactggctg gtgtggagag tcgtgggtgcg gaacaagatc	960
tcctatttcc gccacgccgc cctgctcaac atggtgttct gcttgctggc cgcagacact	1020
tgcttcctgg gcgccccatt cctctctcca gggccccgaa gcccgctctg ccttgctgcc	1080
gccttcctct gtcatcttct ctacctggcc accttttctt ggatgctggc gcaggccctg	1140
gtgttgcccc accagctgct ctttgtcttt caccagctgg caaagcaccg agttctcccc	1200
ctcatggtgc tcctgggcta cctgtgcccc ctggggttgg cagggtgtcac cctggggctc	1260
tacctacctc aagggaata cctgaggagg ggggaatgct ggttggatgg gaaggaggagg	1320
gcgttataca ccttcgtggg gccagtgtg gccatcatag gcgtgaatgg gctggtacta	1380
gccatggcca tgctgaagtt gctgagacct tcgctgtcag agggaccccc agcagagaag	1440
cgccaagctc tgctgggggt gatcaaagcc ctgctcattc ttacacccat ctttggcctc	1500
acctgggggc tgggcctggc cactctgta gaggaagtct ccacggctcc tcattacatc	1560
ttcaccattc tcaacacctt ccagggcgtc ttcatactat tgtttgggtg cctcatggac	1620
aggaagatac aagaagcttt gcgcaaagc ttctgccgag cccaagcccc cagctccacc	1680
atctccctgg ccacaaatga aggctgcatc ttggaacaca gcaaaggagg aagcgacact	1740

23/34

gccaggaaga cagatgcttc agag

1764

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding hTGR21-4

&lt;400&gt; 13

gtcgacatga aatacgtggc caaggtggtg g 31

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 675

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 14

Met Ala Asp Thr Thr Tyr Thr Cys Asp Leu Gln Ser Leu Gly Leu Ala

5

10

15

Pro Leu Arg Val Pro Ile Ser Ile Thr Ile Ile Gln Asp Gly Asp Ile

20

25

30

Thr Cys Pro Glu Asp Ala Ser Val Leu Thr Trp Asn Val Thr Lys Ala

35

40

45

Gly His Val Ala Gln Ala Pro Cys Pro Glu Ser Lys Arg Gly Ile Val

50

55

60

Arg Arg Leu Cys Gly Ala Asp Gly Val Trp Gly Pro Val His Ser Ser

65

70

75

80



24/34

Cys Thr Asp Ala Arg Leu Leu Ala Leu Phe Thr Arg Thr Lys Leu Leu  
                             85                            90                            95  
 Gln Ala Gly Gln Gly Ser Pro Ala Glu Glu Val Pro Gln Ile Leu Ala  
                             100                            105                            110  
 Gln Leu Pro Gly Gln Ala Ala Glu Ala Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu  
                             115                            120                            125  
 Thr Leu Leu Ser Thr Met Lys Tyr Val Ala Lys Val Val Ala Glu Ala  
                             130                            135                            140  
 Arg Ile Gln Leu Asp Arg Arg Ala Leu Lys Asn Leu Leu Ile Ala Thr  
                             145                            150                            155                            160  
 Asp Lys Val Leu Asp Met Asp Thr Arg Ser Leu Trp Thr Leu Ala Gln  
                             165                            170                            175  
 Ala Arg Lys Pro Trp Ala Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ala Val Glu Thr  
                             180                            185                            190  
 Leu Ala Cys Ser Leu Cys Pro Gln Asp Tyr Pro Phe Ala Phe Ser Leu  
                             195                            200                            205  
 Pro Asn Val Leu Leu Gln Ser Gln Leu Phe Gly Pro Thr Phe Pro Ala  
                             210                            215                            220  
 Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Pro Thr Arg Pro Pro Leu Gln Ala Gln Ile  
                             225                            230                            235                            240  
 Pro Arg His Ser Leu Ala Pro Leu Val Arg Asn Gly Thr Glu Ile Ser  
                             245                            250                            255  
 Ile Thr Ser Leu Val Leu Arg Lys Leu Asp His Leu Leu Pro Ser Asn  
                             260                            265                            270  
 Tyr Gly Gln Gly Leu Gly Asp Ser Leu Tyr Ala Thr Pro Gly Leu Val  
                             275                            280                            285  
 Leu Val Ile Ser Ile Met Ala Gly Asp Arg Ala Phe Ser Gln Gly Glu  
                             290                            295                            300  
 Val Ile Met Asp Phe Gly Asn Thr Asp Gly Ser Pro His Cys Val Phe

25/34

305	310	315	320
Trp Asp His Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Trp Ser Lys Glu Gly			
325	330	335	
Cys Gln Ala Gln Val Ala Ser Ala Ser Pro Thr Ala Gln Cys Leu Cys			
340	345	350	
Gln His Leu Thr Ala Phe Ser Val Leu Met Ser Pro His Thr Val Pro			
355	360	365	
Glu Glu Pro Ala Leu Ala Leu Leu Thr Gln Val Gly Leu Gly Ala Ser			
370	375	380	
Ile Leu Ala Leu Leu Val Cys Leu Gly Val Tyr Trp Leu Val Trp Arg			
385	390	395	400
Val Val Val Arg Asn Lys Ile Ser Tyr Phe Arg His Ala Ala Leu Leu			
405	410	415	
Asn Met Val Phe Cys Leu Leu Ala Ala Asp Thr Cys Phe Leu Gly Ala			
420	425	430	
Pro Phe Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ser Pro Leu Cys Leu Ala Ala Ala			
435	440	445	
Phe Leu Cys His Phe Leu Tyr Leu Ala Thr Phe Phe Trp Met Leu Ala			
450	455	460	
Gln Ala Leu Val Leu Ala His Gln Leu Leu Phe Val Phe His Gln Leu			
465	470	475	480
Ala Lys His Arg Val Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Tyr Leu Cys			
485	490	495	
Pro Leu Gly Leu Ala Gly Val Thr Leu Gly Leu Tyr Leu Pro Gln Gly			
500	505	510	
Gln Tyr Leu Arg Glu Gly Glu Cys Trp Leu Asp Gly Lys Gly Gly Ala			
515	520	525	
Leu Tyr Thr Phe Val Gly Pro Val Leu Ala Ile Ile Gly Val Asn Gly			
530	535	540	

26/34

Leu Val Leu Ala Met Ala Met Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser  
 545 550 555 560  
 Glu Gly Pro Pro Ala Glu Lys Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys  
 565 570 575  
 Ala Leu Leu Ile Leu Thr Pro Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly  
 580 585 590  
 Leu Ala Thr Leu Leu Glu Glu Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe  
 595 600 605  
 Thr Ile Leu Asn Thr Leu Gln Gly Val Phe Ile Leu Leu Phe Gly Cys  
 610 615 620  
 Leu Met Asp Arg Lys Ile Gln Glu Ala Leu Arg Lys Arg Phe Cys Arg  
 625 630 635 640  
 Ala Gln Ala Pro Ser Ser Thr Ile Ser Leu Ala Thr Asn Glu Gly Cys  
 645 650 655  
 Ile Leu Glu His Ser Lys Gly Gly Ser Asp Thr Ala Arg Lys Thr Asp  
 660 665 670  
 Ala Ser Glu  
 675

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 2025

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 15

atggctgaca ccacgtacac ttgtgacctg cagagcctgg gcctggctcc actcagggtc 60  
 cccatctcca tcaccatcat ccaggatgga gacatcacct gccctgagga cgcctcgggt 120  
 ctcacctgga atgtcaccaa ggctggccac gtggcacagg ccccatgtcc tgaagcaag 180  
 aggggcatag tgaggaggct ctgtggggct gacggagtct gggggccggt ccacagcagc 240

27/34

tgcacagatg cgaggctcct ggccttgttc actagaacca agctgctgca ggcaggccag 300  
 ggcagtcctg ctgaggaggt gccacagatc ctggcacagc tgccaggga ggcggcagag 360  
 gcaagttcac cctccgactt actgaccctg ctgagcacca tgaaatacgt ggccaagggtg 420  
 gtggcagagg ccagaataca gcttgaccgc agagccctga agaattctct gattgccaca 480  
 gacaaggicc tagatatgga caccaggctc ctgtggacce tggcccaagc ccggaagccc 540  
 tgggcaggct cgactctcct gctggctgtg gagaccctgg catgcagcct gtgccacag 600  
 gactaccctc tcgccttcag cttacccaat gtgctgctgc agagccagct gtttggacce 660  
 acgtttcctg ctgactacag catctccttc cctactcggc cccactgca ggctcagatt 720  
 cccaggcact cactggcccc attggtcctg aatggaactg aaataagtat tactagcctg 780  
 gtgctgcgaa aactggacca cttctgccc tcaaactatg gacaagggtt gggggattcc 840  
 ctctatgcca ctctggcct ggtccttgtc atttccatca tggcagggtga ccgggccttc 900  
 agccaggag aggtcatcat ggactttggg aacacagatg gttccctca ctgtgtcttc 960  
 tgggatcaca gtctcttcca gggcaggggg ggttgggtcca aagaagggtg ccaggcacag 1020  
 gtggccagtg ccagccccac tgcctcagtc ctctgccagc acctcactgc ctctccgtc 1080  
 ctcatgtccc cacacactgt tccggaagaa cccgctctgg cgctgctgac tcaagtgggc 1140  
 ttgggagctt ccatactggc gctgcttgtg tgccctgggtg tgtactggct ggtgtggaga 1200  
 gtcgtgggtg ggaacaagat ctctatttc cgccacgccg cctgtctca catggtgttc 1260  
 tgccttgggtg ccgcagacac ttgcttctg ggcgccccat tctctctcc agggccccga 1320  
 agcccgctct gccttgtctg cgccttcctc tgcatttcc tctacctggc cactttttc 1380  
 tggatgctgg cgcaggccct ggtgttggcc caccagctgc tctttgtctt tcaccagctg 1440  
 gcaaagcacc gagttctccc cctcatggtg ctctgggct acctgtgcc actggggtt 1500  
 gcagggtgca ccttggggct ctacctacct caagggaat acctgaggga gggggaatgc 1560  
 tggttggatg ggaaggaggg ggcgttatac acctcgtgg ggccagtgt ggccatcata 1620  
 ggctggaatg ggctggtact agccatggcc atgctgaagt tgctgagacc ttgctgtca 1680  
 gagggacccc cagcagagaa gcgccaagct ctgctggggg tgatcaaagc cctgtctatt 1740  
 ctacaccca tctttggcct cacttggggg ctgggcctgg ccactctgtt agaggaagtc 1800  
 tccaggtcc ctattacat cttaccatt ctcaacacce tccagggcgt cttcatccta 1860  
 ttgtttggtt gcctcatgga caggaagata caagaagctt tgcgcaaagc ctctgcccgc 1920  
 gccaagccc ccagctccac catctccctg gccacaaatg aaggctgcat cttggaacac 1980

28/34

agcaaaggag gaagcgacac tgccaggaag acagatgctt cagag

2025

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding hTGR21-5  
and hTGR21-6

&lt;400&gt; 16

gtcgacatgg ctgacaccac gtacacttgt g 31

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 638

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 17

Met Ala Asp Thr Thr Tyr Thr Cys Asp Leu Gln Ser Leu Gly Leu Ala

5

10

15

Pro Leu Arg Val Pro Ile Ser Ile Thr Ile Ile Gln Asp Gly Asp Ile

20

25

30

Thr Cys Pro Glu Asp Ala Ser Val Leu Thr Trp Asn Val Thr Lys Ala

35

40

45

Gly His Val Ala Gln Ala Pro Cys Pro Glu Ser Lys Arg Gly Ile Val

50

55

60

Arg Arg Leu Cys Gly Ala Asp Gly Val Trp Gly Pro Val His Ser Ser

29/34

65		70		75		80
Cys Thr Asp Ala Arg Leu Leu Ala Leu Phe Thr Arg Thr Lys Leu Leu						
	85		90		95	
Gln Ala Gly Gln Gly Ser Pro Ala Glu Glu Val Pro Gln Ile Leu Ala						
	100		105		110	
Gln Leu Pro Gly Gln Ala Ala Glu Ala Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu						
	115		120		125	
Thr Leu Leu Ser Thr Met Lys Tyr Val Ala Lys Val Val Ala Glu Ala						
	130		135		140	
Arg Ile Gln Leu Asp Arg Arg Ala Leu Lys Asn Leu Leu Ile Ala Thr						
145		150		155		160
Asp Lys Val Leu Asp Met Asp Thr Arg Ser Leu Trp Thr Leu Ala Gln						
	165		170		175	
Ala Arg Lys Pro Trp Ala Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ala Val Glu Thr						
	180		185		190	
Leu Ala Cys Ser Leu Cys Pro Gln Asp Tyr Pro Phe Ala Phe Ser Leu						
	195		200		205	
Pro Asn Val Leu Leu Gln Ser Gln Leu Phe Gly Pro Thr Phe Pro Ala						
	210		215		220	
Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Pro Thr Arg Pro Pro Leu Gln Ala Gln Ile						
225		230		235		240
Pro Arg His Ser Leu Ala Pro Leu Val Arg Asn Gly Thr Glu Ile Ser						
	245		250		255	
Ile Thr Ser Leu Val Leu Arg Lys Leu Asp His Leu Leu Pro Ser Asn						
	260		265		270	
Tyr Gly Gln Gly Leu Gly Asp Ser Leu Tyr Ala Thr Pro Gly Leu Val						
	275		280		285	
Leu Val Ile Ser Ile Met Ala Gly Asp Arg Ala Phe Ser Gln Gly Glu						
	290		295		300	

30/34

Val	Ile	Met	Asp	Phe	Gly	Asn	Thr	Asp	Gly	Ser	Pro	His	Cys	Val	Phe
305					310					315					320
Trp	Asp	His	Ser	Leu	Phe	Gln	Gly	Arg	Gly	Gly	Trp	Ser	Lys	Glu	Gly
				325					330					335	
Cys	Gln	Ala	Gln	Val	Ala	Ser	Ala	Ser	Pro	Thr	Ala	Gln	Cys	Leu	Cys
		340						345					350		
Gln	His	Leu	Thr	Ala	Phe	Ser	Val	Leu	Met	Ser	Pro	His	Thr	Val	Pro
	355						360					365			
Glu	Glu	Pro	Ala	Leu	Ala	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Gly	Leu	Gly	Ala	Ser
	370					375					380				
Ile	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Gly	Val	Tyr	Trp	Leu	Val	Trp	Arg
385					390					395					400
Val	Val	Val	Arg	Asn	Lys	Ile	Ser	Tyr	Phe	Arg	His	Ala	Ala	Leu	Leu
				405					410					415	
Asn	Met	Val	Phe	Cys	Leu	Leu	Ala	Ala	Asp	Thr	Cys	Phe	Leu	Gly	Ala
		420						425					430		
Pro	Phe	Leu	Ser	Pro	Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Cys	Leu	Ala	Ala	Ala
	435						440					445			
Phe	Leu	Cys	His	Phe	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr	Phe	Phe	Trp	Met	Leu	Ala
	450					455					460				
Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	His	Gln	Leu	Leu	Phe	Val	Phe	His	Gln	Leu
465					470					475				480	
Ala	Lys	His	Arg	Val	Leu	Pro	Leu	Met	Val	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Cys
				485					490					495	
Pro	Leu	Gly	Leu	Ala	Gly	Val	Thr	Leu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Pro	Gln	Gly
		500						505				510			
Gln	Tyr	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Cys	Trp	Leu	Asp	Gly	Lys	Gly	Gly	Ala
	515						520					525			
Leu	Tyr	Thr	Phe	Val	Gly	Pro	Val	Leu	Ala	Ile	Ile	Gly	Val	Asn	Gly

31/34

530	535	540
Leu Val Leu Ala Met Ala Met Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser		
545	550	555
Glu Gly Pro Pro Ala Glu Lys Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys		
	565	570
Ala Leu Leu Ile Leu Thr Pro Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly		
	580	585
Leu Ala Thr Leu Leu Glu Glu Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe		
	595	600
Thr Ile Leu Asn Thr Leu Gln Gly Gly Asp Arg Gly Val Ala Val Phe		
	610	615
Phe Ala Phe Leu Asp Gly Leu Ser His Cys Arg Ser Leu Leu		
625	630	635

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1914

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 18

atggctgaca ccacgtacac ttgtgacctg cagagcctgg gcctggctcc actcagggtc	60
cccatctcca tcaccatcat ccaggatgga gacatcacct gccctgagga cgcctcgggtg	120
ctcacctgga atgtcaccaa ggctggccac gtggcacagg ccccatgtcc tgagagcaag	180
aggggcatag tgaggaggct ctgtggggct gacggagtct gggggccggt ccacagcagc	240
tgcacagatg cgaggctcct ggccttgttc actagaacca agctgtctgca ggcaggccag	300
ggcagtcctg ctgaggaggt gccacagatc ctggcacagc tgccaggga ggcggcagag	360
gcaagttcac cctccgactt actgaccctg ctgagcacca tgaaatacgt ggccaaggtg	420
gtggcagagg ccagaatata gcctgaccgc agagccctga agaattctct gattgccaca	480
gacaaggicc tagatatgga caccaggctt ctgtggaccc tggcccaagc ccggaagccc	540



32/34

tgggcaggct	cgactctcct	gctggctgtg	gagaccctgg	catgcagcct	gtgcccacag	600
gactaccctt	tgccttcag	cttacccaat	gtgctgtgc	agagccagct	gtttggacce	660
acgtttcctg	ctgactacag	catctccitc	cctactcggc	ccccactgca	ggctcagatt	720
cccaggcact	cactggcccc	attggctcgt	aatggaactg	aaataagtat	tactagcctg	780
gtgctgcgaa	aactggacca	ccittctgccc	tcaaactatg	gacaagggct	gggggattcc	840
ctctatgcca	ctcctggcct	ggtccttgtc	atttccatca	tggcagggtga	ccgggccttc	900
agccagggag	aggtcatcat	ggactttggg	aacacagatg	gttccccctca	ctgtgtcttc	960
tgggatcaca	gtctctttcca	gggcaggggg	ggttgggtcca	aagaaggggtg	ccaggcacag	1020
gtggccagtg	ccagcccccac	tgcctcagtc	ctctgccagc	acctcactgc	cttctccgtc	1080
ctcatgtccc	cacacactgt	tccggaagaa	cccgtcttgg	cgtctgtgac	tcaagtgggc	1140
ttgggagctt	ccatactggc	gctgcttgtg	tgcctgggtg	tgtactggct	gggtgtggaga	1200
gtcgtgggtg	ggaacaagat	ctcctatitc	cgccacgccg	ccctgtctcaa	catgggtgttc	1260
tgcttgtctg	ccgcagacac	ttgcttccctg	ggcgccccat	tcctctctcc	agggccccga	1320
agcccgtctt	gccttgcctg	cgccttcctc	tgtcatttcc	tctacctggc	caccttttcc	1380
tggatgctgg	cgcaggccct	ggtgttggcc	caccagctgc	tctttgtctt	tcaccagctg	1440
gcaaagcacc	gagttctccc	cctcatgggtg	ctcctgggct	acctgtgccc	actgggggtg	1500
gcagggtgtca	ccctggggct	ctacctacct	caagggaat	acctgaggga	gggggaatgc	1560
tggttggatg	ggaaggagg	ggcgttatac	accttcgttg	ggccagtgtc	ggccatcata	1620
ggcgtgaatg	ggctggtact	agccatggcc	atgctgaagt	tgctgagacc	ttcgctgtca	1680
gagggacccc	cagcagagaa	gcgccaagct	ctgctggggg	tgatcaaagc	cctgctcatt	1740
cttacaccca	tctttggcct	cacctggggg	ctgggcctgg	ccactctgtt	agaggaagtc	1800
tccacggtec	ctcattacat	cttcaccatt	ctcaacaccc	tccagggcgg	tgataggggg	1860
gtggctgtgt	tttttgcttt	tttagatgg	ctaagtcact	gccgatctct	tctc	1914

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

33/34

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR21-6

&lt;400&gt; 19

tactagtcta gagaagagat cggcagtgac tt 32

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 20

ctacagcatc tccttccta ctcg 24

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; primer

&lt;400&gt; 21

ttttcgcagc accaggcta 19

&lt;210&gt; 22

34/34

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> prove

<400> 22

ccccattggt ccgtaatgga actgaa

36

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11530

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/705, C12N15/12, C12P21/02, C12P21/08, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K45/00, A61K45/06, A61P9/10, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/705, C12N15/12, C12Q1/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/Geneseq, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, WPI (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/08053 A1 (Kazusa DNA Res. Inst., Takeda Chem. Ind., Ltd.), 17 February, 2000 (17.02.2000), & EP 1103562 A1 & JP 2000-50875 A	1-13, 16, 18, 21-24, 26-27
A	WO 00/15793 A2 (Incyte Pharmaceuticals, Inc.), 23 March, 2000 (23.03.2000), & EP 1114155 A2	1-13, 16, 18, 21-24, 26-27
P, X	WO 01/57275 A2 (Molecular Dynamics, Inc.), 09 August, 2001 (09.08.2001), SEQ ID. NO:29306	1-13, 16, 18, 21-24, 26-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 February, 2002 (15.02.02)		Date of mailing of the international search report 26 February, 2002 (26.02.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11530

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 25,33  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

These claims pertain to methods for diagnosis or methods for treatment of the human body.

2. ☒ Claims Nos.: 14,15,17,19,20,28-34  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Although the substances (ligands and compounds) described in claims 14, 15, 17, 19, 20 and 28 to 34 involves any substances binding to the GPCR as set forth in claim 1 or altering the binding properties thereof, no specific substance having these functions is cited in the description. Namely, these substances per se and inventions with the use of the same are neither supported by the description nor disclosed therein. Further, the above claims are described in an extremely unclear manner.

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/705、C12N15/12、C12P21/02、C12P21/08、C12Q1/02、C12Q1/68、A61K45/00、A61K45/06、  
A61P9/10、A61P43/00、G01N33/15、G01N33/50、G01N33/53、G01N33/566

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/705、C12N15/12、C12Q1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SwissProt/PIR/Geneseq、GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq、  
WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/08053 A1 (Kazusa DNA Res Inst, Takeda Chem Ind Ltd) 2000. 02. 17 & EP 1103562 A1 & JP 2000-50875 A	1-13, 16, 18, 21-24, 26-27
A	WO 00/15793 A2 (Incyte Pharmaceuticals Inc) 2000. 03. 23 & EP 1114155 A2	1-13, 16, 18, 21-24, 26-27
P, X	WO 01/57275 A2 (Molecular Dynamics Inc) 2001. 08. 09 SEQ ID NO:29306	1-13, 16, 18, 21-24, 26-27

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 02. 02

国際調査報告の発送日

26.02.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照



4B

8412

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 25、33 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
人の身体の診断方法又は治療方法に係る発明が記載されている。
2. ☒ 請求の範囲 14、15、17、19、20、28-34 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲14、15、17、19、20、28-34に記載の物質 (リガンド、化合物) は、請求の範囲1のGPCRに結合性を有するか当該結合性を変化させるあらゆる物質を包含するものであるが、明細書には、このような機能を有する物質が具体的に記載されていないから、当該物質自体及びそれを利用する発明は明細書による裏付けを欠き、開示も欠き、かつ前記請求の範囲の記載は著しく不明瞭である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。